



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ZAIRA BRUNA HOFFMAM

ESTUDO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS DE *Xanthomonas citri* subsp.
citri str. 306

CAMPINAS

2017

ZAIRA BRUNA HOFFMAM

ESTUDO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str.

306

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na Área de Bioquímica.

ESTE ARQUIVO DIGITAL EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
ZAIRA BRUNA HOFFMAM E ORIENTADA
PELO PROF. DR. MÁRIO TYAGO MURAKAMI.

Orientador/ Supervisor: Mário Tyago Murakami

Coorientador/Co-supervisor: Roberto Ruller

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 140791/2013-2

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9134-4842>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

H675e Hoffmam, Zaira Bruna, 1987-
Estudo de enzimas xilanolíticas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str. 306 /
Zaira Bruna Hoffmam. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Mário Tyago Murakami.

Coorientador: Roberto Ruller.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Xilanases. 2. Hemicelulose. 3. *Xanthomonas*. I. Murakami, Mário Tyago.
II. Ruller, Roberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: A study of xylan-degrading enzymes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str. 306

Palavras-chave em inglês:

Xylanases

Hemicellulose

Xanthomonas

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Mário Tyago Murakami [Orientador]

Fernando Segato

Helia Harumi Sato

Simone Cristina Picchi

Roberto da Silva

Data de defesa: 07-04-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 07 de abril de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Tyago Murakami (Orientador)

Prof. Dr. Fernando Segato

Profa. Dra. Helia Harumi Sato

Prof. Dra. Simone Cristina Picchi

Prof. Dr. Roberto da Silva

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

“Eu estou entre aqueles que acreditam que a ciência é belíssima. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico. Ele também é uma criança colocada diante de fenômenos naturais que o impressionam como se fossem um conto de fadas.”

(Marie Curie)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo aprendizado, “...a sabedoria que vem do alto é antes de tudo pura; depois, pacífica, amável, compreensiva, cheia de misericórdia e de bons frutos, imparcial e sincera”.

Agradeço minha família pelo companheirismo, por toda ajuda que recebi para que hoje pudesse estar defendendo essa tese. Agradeço minha querida mãe, Dona Ervina, que infelizmente faleceu pouco antes de ver esse sonho concretizado. Mãe, a Senhora mal sabia escrever, mas era gigantesca e inatingível no que realmente importa para a vida: sabedoria, bondade e amor. Presenteou a mim com seus ensinamentos tudo que era necessário: honestidade, perseverança e otimismo. Jamais conseguiria agradecer de forma apropriada sua importância na minha vida e tudo que fez por mim. Agradeço ao meu Pai, Natanael, pelo seu amor incondicional e por não medir esforços para cuidar de seus filhos e netos. Às minhas irmãs, Zenia, Zione e Zogaide e aos meus irmãos, Elpídio e Enio, agradeço pelos incentivos. Aos meus sobrinhos, Brisa, Isabella, Júlio César, Maísa, Mariana, Maurício e Sophia agradeço pelo amor e pela alegria.

Ao Érico pelo amor, dedicação, companheirismo, carinho e incentivos. À Thelma agradeço por ter me acolhido como filha e por ser tão generosa e preocupada comigo. Junia, José, Simone, Isabella e Sônia, obrigada por terem me recebido com grande carinho na vida de vocês.

Ao Mário Murakami agradeço por sua notável competência enquanto profissional e orientador. Para mim sempre foi muito além de um conselheiro de experimentos. É um exemplo de engajamento e respeito pela ciência, por quem guardo profunda admiração. Muito obrigada, Mário!

Ao Roberto Ruller agradeço pelas orientações e por ter sido um grande incentivador durante todos esses anos de pós-graduação. Muito obrigada pela confiança, pela contribuição irrestrita e sobretudo por ser um grande amigo.

Camila Santos, Letícia Zanthorlin, José Alberto e Vanesa Peixoto, muito obrigada pela colaboração produtiva nos experimentos da tese. A competência de vocês foi fundamental para a concretização desse trabalho.

Jaciane Ienczak e Sarita Rabelo, obrigada pelo contundente aprendizado profissional que me proporcionaram durante esses anos de trabalho em projeto. Foi fenomenal ter tido a oportunidade de aprender com os ensinamentos e com a competência profissional de vocês. Mas não só por isso, agradeço sobretudo pela amizade, pela confiança, pelas ótimas risadas (ótimas mesmo!!!), e porque são grandes e generosas mulheres que inspiram e enfrentam todos os desafios com muita força!

A todos os amigos! Ana Luísa, Jaqueline Matsusato, Lauren Bergmann e Laerti Reis obrigada pela parceria tão legal, feliz e produtiva esses anos. José Alberto, Beto, agradeço por me ajudar em tudo, sempre me inspirou com seu empenho e sua forma disciplinada de trabalho. Amanda Sousa, Camila Caldana, Carla Codima, Carolina Bonan, Deise Lima, Evandro Lima, Fernanda Buchli, João Paulo, Junio Cota, Priscila Delabona, Raquel Scatolin, Rebeca Mariano, Samantha Santos, Suzane Rodrigues, Thiago Augusto, Valéria Mafra, Viviane Heinzen, muito obrigada! Sinto-me plenamente agraciada pela amizade de vocês. Tatiane Madruga, não sei pelo que sou mais grata, se pela ajuda com todos os problemas burocráticos, se pelos cafés, se pelas comidas, ou por ser essa lindeza de pessoa! Letícia Zanphorlin novamente obrigada, não só pela colaboração profissional, mas também pela amizade, por me motivar incondicionalmente e por ter trazido essa lindeza que é a Maria Clara para nós de presente!

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, ao Laboratório Nacional de Biociências e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron agradeço por terem recebido em suas instalações a pesquisa experimental dessa Tese e à Universidade Estadual de Campinas, ao Instituto de Biologia e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular por terem fornecido os instrumentos legais para sua concretização.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agradeço pelos auxílios financeiros para a execução dos experimentos.

RESUMO

Patógenos do gênero *Xanthomonas* infectam uma larga variedade de culturas com relevância econômica e seu sistema CUT xilanolítico (*Carbohydrate Utilization with TOnB-dependent outer membrane transporters*) contém duas proteínas relacionadas como xilanases, XynA e XynB, que se destacam por afetar a formação de biofilme e a virulência. Nesse trabalho os produtos dos genes *xynA* (XAC4249) e *xynB* (XAC4254) pertencentes ao fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str. 306 foram investigados funcional e estruturalmente visando elucidar mecanismos moleculares responsáveis pela degradação de xilano. A caracterização de propriedades bioquímicas e biofísicas demonstrou que XynA não é uma endo- β -1,4-xilanase, como previamente anotada por predições, mas sim uma rara exo-oligoxilanase que atua em extremidades redutoras liberando xilose do polímero xilano e de xilooligossacarídeos. Análises estruturais revelaram que uma inserção na alça β 7- α 7 de XynA induz a dimerização dessa proteína, promovendo uma barreira física no subsítio +2, e essa característica peculiar é responsável por seu modo de ação único dentre os membros da família GH10. A mutação de um único resíduo de aminoácido que impede a dimerização tornou XynA capaz de hidrolisar xilano. Além disso, a adaptação dessa alça para transformá-la em um segmento canônico de xilanases GH10 resultou em uma endo- β -1,4-xilanase altamente ativa. Por sua vez, a enzima XynB, que possui a sequência mais divergente, mostrou-se uma endo- β -1,4-xilanase genuína. XynB possui um sítio de ligação ao íon Ca^{2+} , do qual depende sua atividade catalítica e também sua estabilidade estrutural. Tanto XynA quanto XynB mostraram-se capazes de hidrolisar o licor rico em xilo-oligômeros oriundos de pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar atingindo valores em torno de 30% de conversão. Os resultados desse trabalho cooperam com o esclarecimento das bases moleculares às quais *Xanthomonas citri* subsp. *citri* recorre para a degradação de xilano, além de sugerir uma interação sinérgica entre as enzimas na infecção e na patogênese. As descobertas apresentadas indicam que XynB contribui para degradar a barreira da parede celular, o que facilita a translocação de proteínas efetoras e fornece nutrientes. Por sua vez, XynA possivelmente participa na supressão da resposta imune induzida por oligossacarídeos.

ABSTRACT

Xanthomonas pathogens attack a variety of economically-relevant plants and their xylan CUT system (Carbohydrate Utilization with TonB-dependent outer membrane transporter system) contains two major xylanase-related genes, XynA and XynB, which influence biofilm formation and virulence. The aim of this thesis was to investigate functionally and structurally the products of the genes *xynA* (XAC4249) and *xynB* (XAC4254) belonging to the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str. 306, which could elucidate the molecular mechanisms responsible for xylan degradation. Herein, we demonstrated that XynA is a rare reducing-end xylose-releasing exo-oligoxylanase and not an endo- β -1,4-xylanase as predicted. Structural analysis revealed that an insertion in the β 7- α 7 loop induces dimerization and promotes a physical barrier at the +2 subsite conferring this unique mode of action within the GH10 family. A single mutation that impaired dimerization became XynA active against xylan and high endolytic activity was achieved when this loop was tailored to match a canonical sequence of endo-1,4- β -xylanases, supporting our mechanistic model. On the other hand, the divergent XynB showed to be a classical endo- β -1,4-xylanase, despite the low sequence similarity to characterized GH10 xylanases. Interestingly, this enzyme contains a calcium ion bound nearby to the glycone-binding region, which is required for catalytic activity and structural stability. Both XynA and XynB were able to hydrolyze the liquor concentrated in xylooligomers from the hydrothermal pretreatment of the sugarcane bagasse, reaching conversion values around 30%. These results shed light on the molecular basis for xylan degradation by *Xanthomonas* and suggest how these enzymes synergistically assist infection and pathogenesis. Our findings indicate that XynB contributes to breach the plant cell-wall barrier providing nutrients and facilitating the translocation of effector molecules, whereas the exo-oligoxylanase XynA possibly participates in the suppression of oligosaccharide-induced immune responses.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTS – Ácido 8-aminopireno-1,3,6-trissulfônico

CAZy – do inglês *Carbohydrate Active Enzymes Database*

CD – do inglês *Circular Dichroism* (Dicroísmo Circular)

CWDE – do inglês *Plant Cell-Wall Degrading Enzyme* (Enzima degradadora de parede celular)

DAMPs – do inglês *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules* (Padrões moleculares associados a dano celular)

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

E.coli – *Escherichia coli*

GH – do inglês *Glycoside Hydrolases* (Hidrolases glicosídicas)

kb – kilobase

kDa – Kilodaltons

PAMPs- do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (Padrões moleculares associados a patógenos)

PDB – do inglês *Protein Data Bank*

SAXS – do inglês *Small-Angle X-Ray Scattering* (Espalhamento de raios X a baixo ângulo)

Xac – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Xcc – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Xoo – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Xcv – *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

4-O-MeGlcA – ácido 4-O-metil-D-glicurônico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1 – INTRODUÇÃO.....	13
2 – OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 O cancro cítrico – Um desafio para a produção de frutas cítricas no Brasil	17
3.2 A espécie <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> ou <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	21
3.3 Aspectos gerais da interação planta- <i>Xanthomonas</i> spp.	23
3.4 Xilanases: enzimas desconstrutoras de hemicelulose	27
3.5 Xilanases: a interação planta-patógeno	34
4 – METODOLOGIA	37
4.1 Clonagem, mutagênese e produção das proteínas.....	37
4.2 Ensaio enzimáticos	38
4.3 Análises de carboidratos	39
4.4 Experimentos de espectroscopia e calorimetria	40
4.5 Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)	41
4.6 Cristalografia de raios X.....	41
4.7 Hidrólise de licor rico em xilo-oligossacarídeos	42
5 – RESULTADOS	44
5.1 XynA possui atividade de exo-oligoxilanase e produz xilose.....	44
5.2 Redesenho racional do loop $\beta 7$ - $\alpha 7$ de XynA	50
5.3 A XynB é uma endo-1,4- β -xilanase clássica.....	55
5.4 Cálcio afeta a atividade e estabilidade de XynB	57
5.5 Análise estrutural de XynB revela subsítios positivos divergentes	60
5.6 Base estrutural da importância do íon cálcio para enzima XynB	63
5.7 XynA quimérica e XynB hidrolisam licor rico em xilo-oligossacarídeos extraído de cana-de-açúcar	65
6 – DISCUSSÃO.....	70

6.1 Evolução e função na família GH10	70
6.2 Implicações biológicas: Como as enzimas GH10 contribuem para a patogênese e para o crescimento	71
6.3 Implicações biotecnológicas: alternativas para a degradação de xilano	73
7 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	74
8 – REFERÊNCIAS	76
ANEXO I: ARTIGO PUBLICADO	90
ANEXO II: PARECER DA COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA	92
ANEXO III: DECLARAÇÃO REFERENTE A DIREITOS AUTORAIS	95

1 – INTRODUÇÃO

Enzimas degradadoras de parede celular (CWDE, do inglês *plant cell-wall degrading enzyme*), secretadas pelo sistema de secreção tipo II (T2SS), são requeridas para a virulência e a patogenicidade do gênero *Xanthomonas* (HU, JUN; QIAN; HE, 2007; RAJESHWARI; JHA; SONTI, 2005; RAY; RAJESHWARI; SONTI, 2000). Tal grupo de enzimas, do qual pode-se destacar xilanases, celulasas e poligalacturanases, degrada os principais polissacarídeos da parede celular, tanto com o objetivo de enfraquecer a primeira barreira física de plantas contra o ataque de patógenos, quanto para liberar nutrientes durante a colonização do hospedeiro (ALBERSHEIM; JONES; ENGLISH, 1969; BÜTTNER; BONAS, 2010; PRESTON; STUDHOLME; CALDELARI, 2005).

Por outro lado, CWDEs podem possuir função dupla durante a infecção, pois sua presença pode ser detectada pelas plantas para acionar respostas de defesa (JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005). Essas enzimas podem ativar o sistema imune inato das plantas tanto por PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) quanto por DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Dano Celular). CWDEs ativam a resposta imune independente da sua atividade enzimática no caso do mecanismo desencadeado por padrões moleculares (PAMP), como demonstrado para xilanases fúngicas, que são reconhecidas por receptores da parede celular da planta (ENKERLI, 1999; FURMAN-MATARASSO *et al.*, 1999; HANANIA; AVNI, 1997). Além disso, os oligossacarídeos, produto da atividade enzimática de CWDEs, induzem a resposta imune por DAMPs. De fato, foi demonstrado que plantas pré-tratadas com hidrolases glicosídicas demonstraram maior resistência contra a infecção por patógenos (FRY *et al.*, 1993; PALVA *et al.*, 1993; RYAN, 1987).

Como previamente proposto e destacado na literatura, parece existir uma ação combinada entre os sistemas de secreção dos tipos II e III, de forma que as CWDEs secretadas por T2SS rompem a parede celular das plantas facilitando a translocação de proteínas efetoras por T3SS (JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2007; SZCZESNY *et al.*, 2010). Vários genes T2SS de *Xanthomonas* spp. são co-regulados com a expressão de componentes de T3SS, corroborando com evidências que suportam esse modelo (JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2007; SZCZESNY *et al.*, 2010; YAMAZAKI; HIRATA; TSUYUMU, 2008).

Curiosamente, as bactérias do gênero *Xanthomonas* contém um grande repertório de genes relacionados à expressão de enzimas para degradação e modificação de parede celular de plantas (pelo menos 160 genes). Um acesso simples ao banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes database*; <http://www.cazy.org>) permite observar que esse número é equivalente ao observado para outros micro-organismos que são especializados na degradação de biomassa vegetal, como *Ruminococcus albus* e *Clostridium cellulolyticum* (LOMBARD *et al.*, 2014). No entanto, *Xanthomonas* spp. infectam plantas preferencialmente por meio de estômatos, hidatódios ou lesões em folhas, sugerindo outras funções para essas enzimas que excedem o papel primário de degradação dos polissacarídeos da parede celular (GOTTWALD; GRAHAM, 1992; GRAHAM *et al.*, 1992).

O sistema xilanolítico, que está presente em todos os micro-organismos lignocelulolíticos, também é encontrado em *Xanthomonas* spp.. Nesses micro-organismos fitopatogênicos, xilanases desempenham papéis importantes na virulência, na formação de biofilme, na captação de nutrientes, e, de modo geral, na adaptação à filosfera (DÉJEAN *et al.*, 2013; RAJESHWARI; JHA; SONTI, 2005; SZCZESNY *et al.*, 2010). Em *Xanthomonas* spp., o sistema xilanolítico faz parte do sistema CUT (Carbohydrate Utilization with TOnB-dependent outer membrane transporters) (BLANVILLAIN *et al.*, 2007) e é composto principalmente por dois genes codificadores de proteínas da família GH10 relatadas como xilanases, além de outras enzimas xilanolíticas, como β -xilosidases, arabinofuranosidases, acetil xilano esterases e α -glicuronidases (DÉJEAN *et al.*, 2013).

Em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, duas proteínas anotadas como xilanases são codificadas pelos genes *xynA* (XAC4249) e *xynB* (XAC4254). Foi previamente demonstrado que *xynA* afeta a formação de biofilme em *X. citri* subsp. *citri* (LI; WANG, 2011) e que os seus genes ortólogos em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (DÉJEAN *et al.*, 2013) e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (RAJESHWARI; JHA; SONTI, 2005) não exibem atividade de xilanase, embora possuam alta identidade de sequência com endo- β -1,4-xilanases clássicas (~45-60%). Em contraste, *XynB* - que apresenta no máximo 30% de identidade com xilanases caracterizadas da família GH10 - mostrou-se ser o maior responsável pela atividade xilanásica em *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. campestris* pv. *campestris*. Em *X. oryzae* pv. *oryzae*, mostrou-se que a deleção do gene correspondente ao *xynB* de *X. citri* subsp. *citri* afeta a virulência e que

a complementação de uma linhagem mutante $\Delta xynB$ com um plasmídeo contendo *xynB* restaurou a capacidade de provocar lesões do tipo selvagem (RAJESHWARI; JHA; SONTI, 2005). Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), a deleção desse gene também implicou em redução da atividade xilanásica extracelular e da virulência (SZCZESNY *et al.*, 2010).

Embora seja evidente a importância funcional dessas proteínas GH10 relatadas como xilanases para o gênero *Xanthomonas*, as bases moleculares de sua ação em polissacarídeos de parede celular vegetal são desconhecidas. Diante desse contexto e visando colaborar com o entendimento do sistema xilanolítico nesses fitopatógenos, esse trabalho se propôs investigar propriedades bioquímicas e biofísicas das proteínas XynA e XynB de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A partir da investigação dessas propriedades, foi possível caracterizar as implicações biológicas e biotecnológicas das atividades das proteínas XynA e XynB.

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar propriedades bioquímicas e biofísicas de enzimas do sistema xilanolítico de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str. 306.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização bioquímica e biofísica do produto do gene *xynA* (XAC4249);
- Construção de proteínas mutadas (XynA-L270R e XynA quimérica) e caracterização das mesmas visando provar os determinantes estruturais que influenciam a atividade da enzima XynA;
- Caracterização bioquímica e biofísica do produto do gene *xynB* (XAC4254);
- Análise da influência bioquímica e estrutural do íon cálcio em XynB;
- Avaliar a performance de XynA quimérica e XynB na hidrólise do licor rico em xilo-oligossacarídeos proveniente do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O cancro cítrico – Um desafio para a produção de frutas cítricas no Brasil

O cancro cítrico, também conhecido como cancro cítrico Asiático ou cancrose A, é uma doença que afeta de forma severa plantas cultivadas em todo o mundo, provocando impactantes perdas econômicas para a agricultura de citros em regiões onde o clima é quente e úmido (BEHLAU, 2006). O agente etiológico dessa doença é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (também denominada *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), que provoca lesões em folhas, frutos e ramos de grande número de espécies da família Rutaceae pertencentes ao gênero *Citrus* (e.g. laranjas, pomelos, tangerinas e limões). A disseminação desse patógeno (Figura 3.1) ocorre pela ação do homem, através do plantio de mudas contaminadas e do trânsito de veículos e materiais de colheitas contaminados entre pomares; e pela ação da natureza, por meio de chuvas e ventos (BARELLI, 2013).

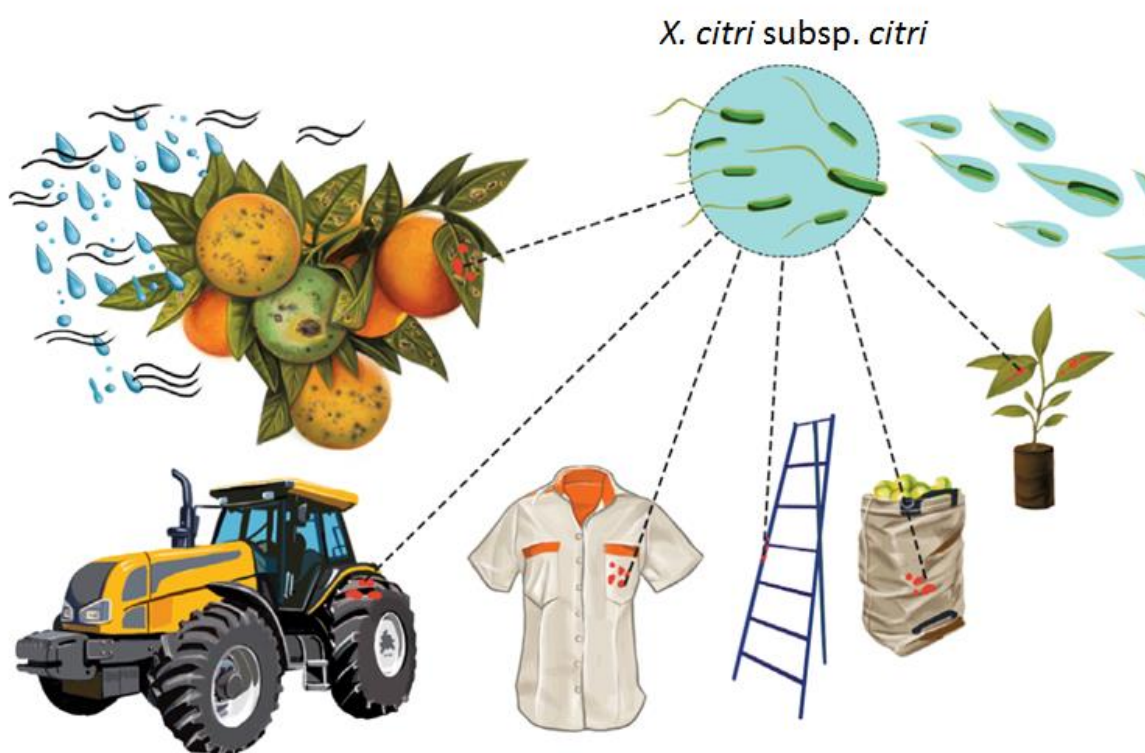


Figura 3.1: Disseminação da bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Figura extraída e adaptada do manual “Cancro cítrico – Medidas essenciais de controle” (FUNDECITRUS, 2008).

Os sintomas característicos do cancro cítrico estão relacionados ao aparecimento de lesões necróticas eruptivas levemente salientes, puntiformes, de cor creme ou pardas, que se tornam esponjosas e esbranquiçadas com a evolução da doença no hospedeiro, podendo ou não ser circundadas por halo amarelo (SCAPIN, 2014) (Figura 3.2) . As condições ideais para o desenvolvimento da doença compreendem a faixa de temperatura entre 25 e 30 °C e elevado teor de umidade (AMARAL, 2003; BEHLAU, 2006). A invasão dos citros ocorre por aberturas naturais, como os estômatos e hidatódios, por ferimentos mecânicos causados pelos equipamentos de manejo, por atrito entre partes da própria planta, e até mesmo por fissuras causadas pela abrasão de partículas de poeira (GRAHAM *et al.*, 1992).

A infecção em folhas ocorre até 45 dias após o início do crescimento, e os sintomas aparecem de 4 a 7 dias após a inoculação. Frutos podem ser acometidos nos três primeiros meses de formação após a queda das pétalas (Figura 3.2). O cancro em si, que é a principal manifestação da doença, é causado pela excessiva divisão celular (hiperplasia) no mesófilo foliar onde houve a infecção, provocando o rompimento da epiderme e seu surgimento em forma de erupção, no meio da lesão (AMARAL, 2003). O Cancro causa danos significativos para a planta, como queda dos frutos e desfolha. Quando o estágio da doença é avançado, a redução da área foliar devido à desfolha diminui a capacidade fotossintética do organismo (BARELLI, 2013; FONSECA, 2012). Além disso, o estresse biótico induz a produção de etileno. Isso provoca queda prematura de folhas, frutos e ramos e prejudica a qualidade dos frutos remanescentes. Os frutos que caem são descartados pois são inadequados para a comercialização *in natura* quanto para a fabricação de sucos (ATTÍLIO, 2013).

Anuários estatísticos de 2014 da FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, mostram o Brasil como o segundo produtor mundial de frutas cítricas, atrás apenas da China (FAO, 2014a, b). A Tabela 3.1 resume os dados de produtividade dos cinco primeiros colocados no *ranking* presente nesses anuários.

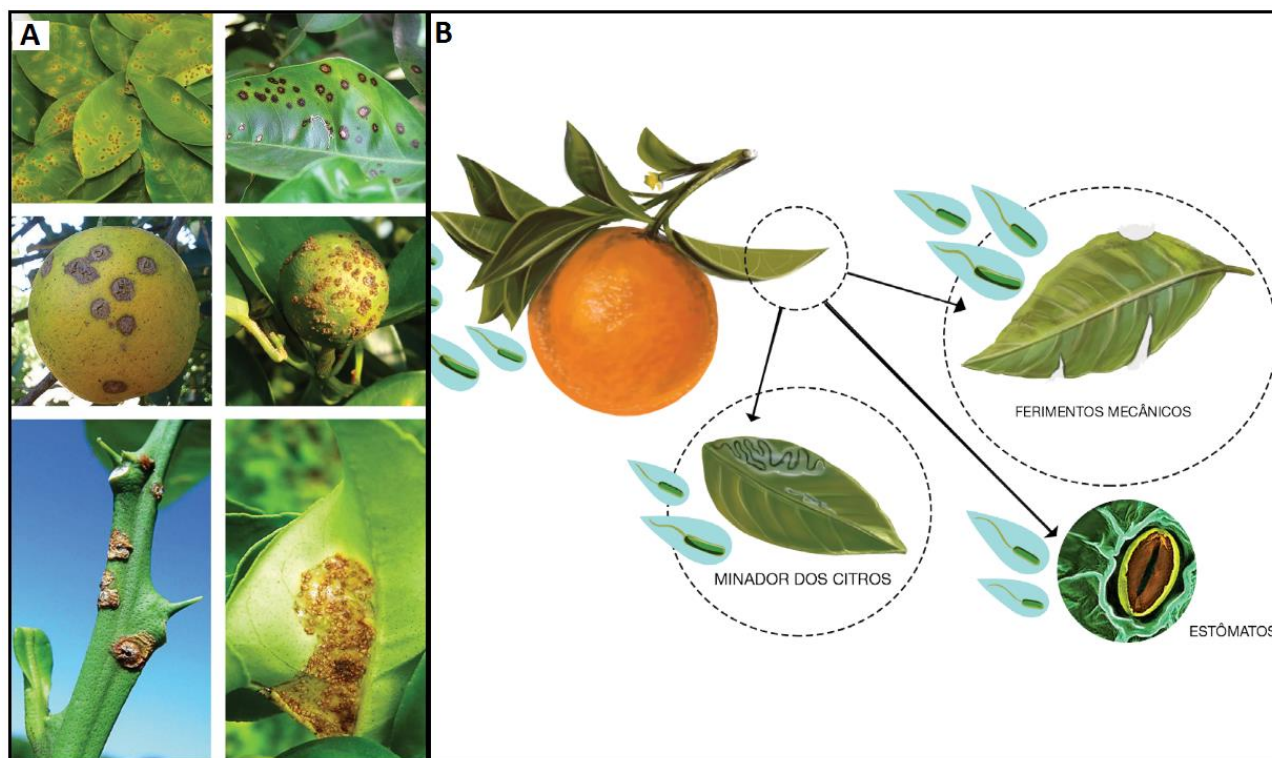


Figura 3.2: Características gerais do cancro cítrico. **(A)** Lesões sintomáticas do cancro cítrico em folhas, frutos e ramos. **(B)** Formas de invasão do hospedeiro pela bactéria causadora da doença. Figura extraída e adaptada do manual “Cancro cítrico – Medidas essenciais de controle” (FUNDECITRUS, 2008).

Tabela 3.1: Topo do *ranking* mundial dos maiores produtores de frutas cítricas em 2011. Tabela adaptada a partir dos anuários estatísticos da FAO de 2014 (FAO, 2014a, b).

País	Área		Produtividade		Produção			
	Total	Crescimento	Total	Crescimento	Total		Crescimento	
	ha (x10 ³) 2011	p.a*. % 2000-2011	hg/ha (x10 ³) 2011	p.a*. % 2000-2011	Ton (x10 ³) 2010	Ton (x10 ³) 2011	1990- 2000	2000- 2011
China	2288	5,5	128,7	5,8	26039	29440	6,1	11,6
Brasil	922,1	-0,5	238,8	0,1	20717,1	22017,6	2,1	-0,3
USA	328,3	-2,5	326,0	-0,9	9979,0	10703,0	4,7	-3,4
Índia	756	4,7	98,8	0,2	9638	7464	4,2	4,9
México	551,4	1,0	129,5	0,4	6912,8	7140,2	6,7	1,5

*Anualmente.

Dentre as frutas cítricas cultivadas extensivamente no Brasil, destaca-se a laranja. O Brasil detém 57% da produção mundial de suco de laranja (KALAKI; NEVES, 2017). Com aproximadamente 490 mil ha plantados, São Paulo é o maior polo citrícola do mundo (FUNDECITRUS, 2017; IEA - INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2017). Certamente os dados nacionais do setor de citricultura são notáveis, porém os valores apresentados na Tabela 3.1 apontam para o Brasil uma tendência de queda nos indicadores desse setor agrícola (área plantada, produtividade e produção total). Embora o País ocupe uma posição de vanguarda no cultivo de citros, pragas como o cancro cítrico, a clorose variegada dos citros, a morte súbita dos citros e o Huanglongbing, mesmo com os avanços tecnológicos, ainda podem resultar em inviabilidade econômica dos pomares.

A primeira constatação da cancriose dos citros no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo. Atualmente a doença está disseminada por vários estados brasileiros, como Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (ROSA, 2010). O cancro é classificado pelo governo brasileiro como praga quarentenária A2, ou seja está presente no país ou região, sob controle permanente, e constitui ameaça à economia agrícola do país ou região importadora exposta (“Agência de Informação Embrapa - Pragas Quarentenárias”, 2015). Ainda em 1957 o Governo Brasileiro decidiu pela eliminação de plantas contaminadas pelo cancro, como medida de controle dessa doença. Atualmente o Brasil ainda adota programas de erradicação com base na eliminação de plantas em áreas infestadas pelo patógeno e há carência de métodos alternativos eficientes de manejo desta doença (ROSA, 2010). A partir de abril de 2017 entrará em vigor no Brasil a Instrução Normativa 37 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que na impossibilidade de adoção das medidas de erradicação, propõe um conjunto de práticas integradas de manejo (Sistema de Mitigação de Risco) para reduzir o risco associado à praga nos produtos comercializados (FUNDECITRUS, 2016).

A legislação de manejo sofreu muitas modificações ao longo do final do século XX e início do XXI, e alguns eventos históricos merecem destaque. No Estado de São Paulo, entre 1999 a 2009 a eliminação de todas as plantas dos talhões infestados era obrigatória quando a incidência de plantas doentes no talhão fosse superior a 0,5% (ROSA, 2010). A adoção dessa metodologia de erradicação rigorosa em 1999 ocorreu em virtude do incremento na

incidência e na severidade do cancro cítrico após o aparecimento em 1996 no território brasileiro da minadora dos citros. A minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) é um inseto que, embora não seja considerada vetor da doença, forma galerias no mesófilo foliar durante sua fase larval. Isso facilita a penetração de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e agrava os danos causados por esse patógeno. Durante a década em que essa legislação foi adotada a doença não foi erradicada, porém foi suprimida a níveis muito baixos ($\leq 0,20$ % de talhões contaminados) (BARELLI, 2013).

Em 2009, a legislação de erradicação no Estado de São Paulo foi amenizada e somente a eliminação das plantas em um raio de 30 m a partir da planta infectada passou a ser obrigatória, independente da incidência da doença no talhão. Essa mudança de legislação teve impacto negativo imediato na incidência da doença, que subiu para 1,39 % dos talhões em 2012, atingindo o maior nível desde a detecção da doença em 1957 (FUNDECITRUS, 2013; “Fundecitrus - Levantamentos - Cancro Cítrico”, 2015). Em outubro de 2013 a legislação foi novamente modificada pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. A partir daquele ano, apenas a planta contaminada deveria ser eliminada e as demais plantas em um raio de 30 m deveriam ser pulverizadas com cobre metálico a cada brotação (“Cancro Cítrico, *Xanthomonas citri* subsp *citri* - Fundecitrus”, 2015). Atualmente estima-se que o índice de talhões contaminados seja de 9%.

A alta incidência da doença inviabilizou de tal modo a erradicação de plantas, que levou o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a publicar uma Instrução Normativa para modificar o controle do cancro cítrico, permitindo a utilização da prática de mitigação de riscos a partir de 2017. A mitigação de risco permitirá ao agricultor manter a planta com cancro cítrico, desde que medidas de manejo sejam adotadas. Incluem-se nessas medidas a instalação de quebra-ventos, o uso de variedades menos suscetíveis, a desinfestação de equipamentos e máquinas, o controle do minador dos citros, e medidas fitossanitárias de proteção das plantas.

3.2 A espécie *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xac), causadora do cancro cítrico, pertence ao filo Proteobacteria do domínio Bacteria. Dentro desse filo, está inserida na classe

Gammaproteobacteria, o maior subgrupo das proteobactérias, que inclui uma grande variedade de tipos fisiológicos. Como as demais proteobactérias, *X. citri* subsp. *citri* é Gram-negativa. Além disso, essa bactéria é também aeróbica estrita, não-esporulante e apresenta motilidade por meio de um flagelo polar (monotríquia). Em placas, apresenta coloração amarelo-alaranjada, devido ao pigmento xantomonadina ligado à membrana (BÜTTNER; BONAS, 2010). Sua condição ótima de sobrevivência é caracterizada por alta umidade e temperaturas entre 20 e 39°C.

Em 1915, Clara Hasse isolou e provou que uma bactéria em forma de bastonete era o agente etiológico do cancro cítrico, doença que estava atacando várias plantações de citros na Florida, Texas e Mississippi (HASSE, 1915). Essa bactéria recebeu então a sua primeira denominação, *Pseudomonas citri*. Ao longo do século XX, *X. citri* subsp. *citri* sofreu diversas mudanças de nomenclatura. Em 1939, Dowson propôs que se chamasse *Xanthomonas citri* [apud (DOWSON, 1943)], nomeando como “*Xanthomonas*” bactérias fitopatogênicas amarelas que possuíam um único flagelo polar. Em 1978, Young e colaboradores propuseram a criação do termo patovar. Essa sugestão deu-se pelo fato de que a maioria das *Xanthomonas* Dowson 1939 diferenciavam-se em relação aos tipos de plantas aos quais eram patogênicas, porém era impossível distinguir espécies dentre essas bactérias por testes bacteriológicos *in vitro*. Dessa forma, criou-se o termo *Xanthomonas campestris* pv. *citri* para se referir à *X. citri* subsp. *citri* (YOUNG *et al.*, 1978).

Com o advento da biologia molecular, em 1995 Vauterin e colaboradores publicaram uma ampla revisão taxonômica do gênero *Xanthomonas*. Esse estudo combinou dados de hibridização DNA-DNA com análises fenotípicas previamente publicadas para dividir 183 linhagens de *Xanthomonas* em 20 grupos homólogos, considerados espécies genômicas. Assim, *X. citri* subsp. *citri* passou a ser denominada *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Esse termo ainda é amplamente utilizado na literatura, pois em 2002 o genoma (DA SILVA *et al.*, 2002) dessa espécie foi publicado utilizando essa denominação (ATTÍLIO, 2013; ROSA, 2010). Entretanto, em 2006 essa bactéria sofreu nova reclassificação, passando oficialmente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Esse novo estudo, mais completo, além de dados de reassociação DNA-DNA e características fenotípicas, também analisou o sequenciamento de regiões espaçadoras intergênicas do rDNA 16S-23S (SCHAAD *et al.*, 2005, 2006).

3.3 Aspectos gerais da interação planta-*Xanthomonas* spp.

Bactérias do gênero *Xanthomonas* são capazes de infectar em torno de quatro centenas de espécies tanto de monocotiledôneas como de dicotiledôneas causando perdas para a agricultura ao redor do planeta em regiões de clima quente e úmido. O sucesso das estratégias de infecção e da multiplicação desses patógenos no tecido hospedeiro depende da secreção de fatores de virulência como adesinas, polissacarídeos e enzimas de degradação de parede celular. A secreção de proteínas destaca-se dentre os fatores imprescindíveis para o êxito de bactérias fitopatogênicas. Proteínas secretadas são usadas pelas bactérias para aderir e degradar a parede celular da planta, para suprimir respostas de defesa ativadas pela invasão e para introduzir o DNA e as proteínas efetoras no citoplasma da célula vegetal (BÜTTNER; BONAS, 2010; PRESTON; STUDHOLME; CALDELARI, 2005).

Ao longo dos anos pesquisadores caracterizaram um vasto número de linhagens bacterianas deficientes em virulência e patogenicidade, mutantes *knock-out* construídos utilizando transposons, e frequentemente as deleções com maior efeito na virulência estavam relacionadas ao *knock-out* de proteínas cruciais para os sistemas de secreção. Entretanto, as investigações experimentais para descobrir a identidade e o papel de proteínas secretadas na patogênese são de difícil execução, pois a maioria dessas proteínas é expressa e secretada apenas quando ocorre o contato do patógeno com a planta. As mutações *knock-out* de proteínas individuais por vezes provocam mudanças no fenótipo que não são óbvias, já que a patogênese depende em si da ação coletiva de uma ampla variedade de proteínas secretadas pelos vários sistemas de secreção bacterianos. Além disso, muitas bactérias patogênicas são fastidiosas e recalcitrantes para manipulações genéticas (PRESTON; STUDHOLME; CALDELARI, 2005).

As duas membranas das bactérias Gram-negativas representam uma barreira dupla entre o citoplasma e o meio externo. Em torno de uma dezena de mecanismos de secreção evoluíram para transportar proteínas através dessas membranas (Figura 3.3). As funções desempenhadas pelos sistemas de secreção dos tipos II (T2SS) e III (T3SS) em relação à patogenicidade em animais e plantas são destacadas pela literatura (BÜTTNER; BONAS, 2010; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005; PRESTON; STUDHOLME; CALDELARI, 2005).

O maior sistema de secreção que transporta proteínas enoveladas para o meio extracelular é o tipo II. Ele secreta toxinas e proteínas no meio celular como proteases, lipases e enzimas de degradação de parede celular que contribuem para a interação planta-patógeno – a maioria das proteínas secretadas pelo T2SS estão envolvidas com a degradação de diferentes componentes da parede celular. O sistema de secreção do tipo II é importante para a virulência de muitas bactérias Gram-negativas fitopatogênicas, incluindo todo o gênero *Xanthomonas* (BÜTTNER; BONAS, 2010).

O T2SS secreta proteínas enoveladas a partir do periplasma e, então, a secreção de proteínas por esse sistema deve ser feita em dois passos. No primeiro, as proteínas são translocadas através da membrana citoplasmática usando as vias dependentes de Sec ou Tat (twin-arginine), e isso depende do peptídeo sinal contido na proteína (PRESTON; STUDHOLME; CALDELARI, 2005). No segundo passo, as proteínas no periplasma são secretadas através da membrana externa pelo ramo terminal do T2SS, que compreende um conjunto de proteínas codificadas por 12 a 16 genes dependendo do organismo. *X. citri* subsp. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* abrigam em seus genomas dois *clusters* gênicos completos do T2SS, *xcs* e *xps*, com os genes individuais designados por letras de A a O e S (BÜTTNER; BONAS, 2010; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005; SZCZESNY *et al.*, 2010).

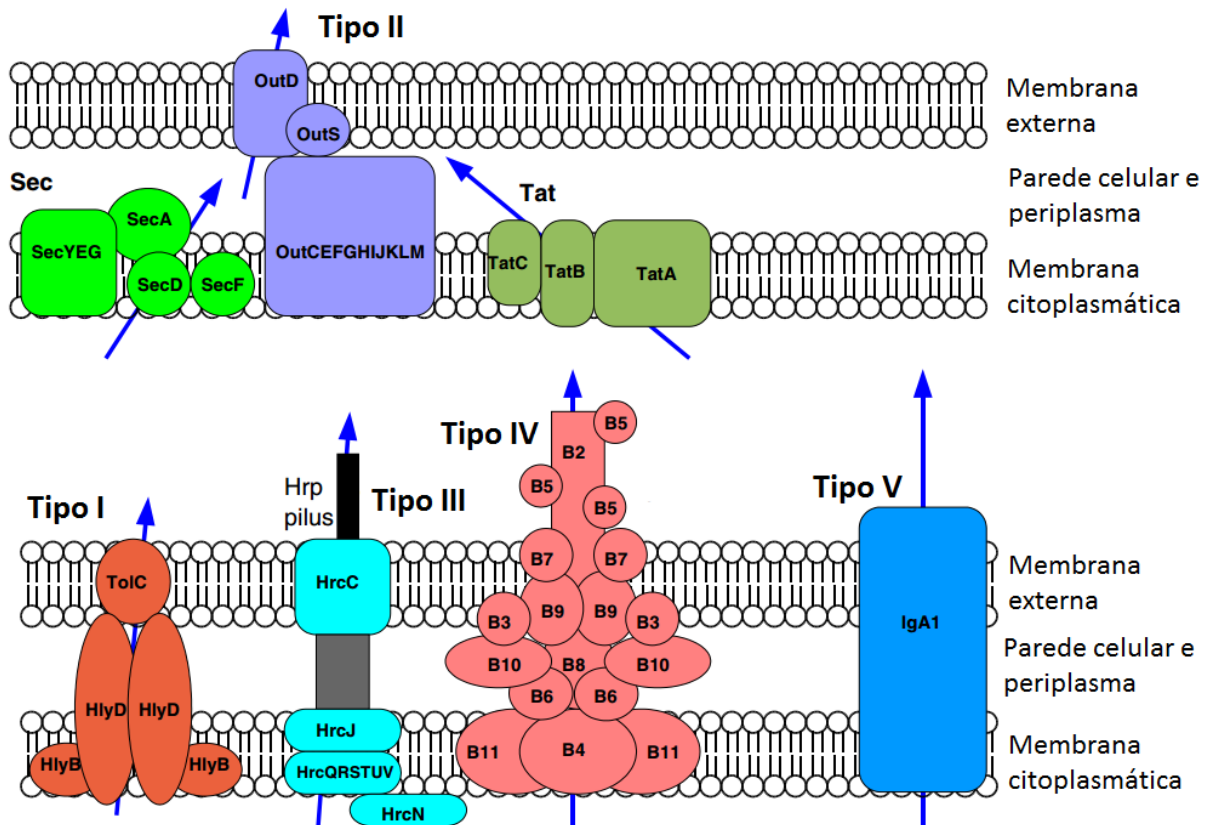


Figura 3.3: Alguns mecanismos de secreção de proteínas em bactérias Gram-negativas (figura extraída de Preston et al. 2005). Os componentes principais de cada sistema de secreção estão ilustrados esquematicamente com números arbitrários atribuídos a subunidades de componentes proteicos multiméricos. Três sistemas de secreção evoluíram para transportar as proteínas através das duas membranas microbianas de forma unificada: tipos I, III e IV. Os sistemas Sec e Tat secretam as proteínas através da membrana interna para o periplasma, de onde elas podem ser sequencialmente transportadas para o meio externo utilizando o ramo terminal do sistema de secreção do tipo II.

A proteína D é a principal componente do T2SS na membrana externa e é considerada uma secretina (ou poro) através da qual os substratos são translocados para o meio externo. A proteína S é uma pequena lipoproteína que também está inserida na membrana externa. S estabiliza a proteína D e promove sua inserção na membrana. A proteína G é uma prepilina-like que se acredita estar relacionada com a formação de um pseudopilus (pilus periplasmático) em conjunto com as demais proteínas do T2SS. De fato, é notável a similaridade entre os componentes do T2SS e do pilus do tipo IV, daí as hipóteses que acreditam que o pseudopilus serve como um pistão que fornece a força necessária para forçar

a extrusão das proteínas a serem secretadas para o espaço extracelular através do poro da secretina (BÜTTNER; BONAS, 2010; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005; PELICIC, 2008).

Plantas e patógenos co-evoluíram durante milhões de anos, tempo suficiente para que as plantas desenvolvessem ações de defesa a partir da detecção da presença de patógenos. Dentre elas, destaca-se a resposta hipersensitiva (HR) com o objetivo de restringir o patógeno à região infectada. A HR consiste em provocar propositalmente o colapso do tecido vegetal em volta do local da infecção, através de lesões ocasionadas pela morte celular programada (LIU *et al.*, 2005). A detecção dos patógenos pode ocorrer tanto por produtos endógenos da planta, como a produção de hormônios apenas liberados pelas feridas, quanto por sinais químicos específicos contidos nos patógenos, os chamados elicitores (ENKERLI, 1999). Dessa maneira, os fatores de virulência, como aqueles secretados por T2SS podem desencadear respostas de defesa da planta (JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2007).

Os patógenos então evoluíram um sistema de secreção, o T3SS, ou sistema de secreção dependente de contato, que é um sistema de secreção especializado encontrado em bactérias patogênicas Gram-negativas que infectam células eucarióticas, tanto plantas quanto animais. T3SS injeta proteínas efetoras no citosol da célula hospedeira para manipular processos da célula da planta, como mecanismos de defesa basais, em prol do desenvolvimento do patógeno (Büttner & Bonas 2010). Por translocar proteínas diretamente no citosol da célula infectada, T3SS é protagonista nas interações com a planta hospedeira (Preston *et al.* 2005). Esse sistema é codificado pelo cluster *hrp* (genes de reação hipersensitiva e patogenicidade) no cromossomo bacteriano, que contém mais de 20 genes organizados em várias unidades transcricionais. Em *X. citri*, 24 genes candidatos a efetores foram identificados no genoma por análises de bioinformática (BÜTTNER; BONAS, 2010).

De fato, foi demonstrado por Jha e colaboradores (2007) em *X. oryzae* que enzimas secretadas por T2SS, no caso uma celulase (ClsA), uma celobiosidase putativa (CbsA) e uma lipase/esterase (LipA), são importantes para a virulência dessa bactéria contra arroz. Esses autores construíram um mutante com o T3SS deletado e provaram que sem a presença desse sistema de secreção os fatores de virulência secretados por T2SS, inclusive purificados e isolados, induzem as respostas basais de defesa do arroz, como a deposição de calose na parede celular. Ou seja, a indução da defesa na planta nesse experimento foi suprimida pelas

proteínas efetoras secretadas pelo sistema de secreção do tipo III, mostrando complementariedade entre T2SS e T3SS (BÜTTNER; BONAS, 2010; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2007).

3.4 Xilanases: enzimas desconstrutoras de hemicelulose

A cada ano a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas métricas de CO₂ e H₂O em produtos vegetais, como a celulose e a hemicelulose. Esses dois grupos de polissacarídeos conjuntamente tornam os carboidratos as biomoléculas mais abundantes do planeta, devido principalmente à atividade anabólica que ocorre nas reações de fixação do carbono da fotossíntese em plantas (NELSON; COX, 2011). A celulose é um homopolissacarídeo linear e não-ramificado, homogêneo, que é formado por resíduos de glicose unidos por ligações do tipo β -1,4. As hidroxilas dos resíduos de glicose formam muitas ligações de hidrogênio, constituindo o conjunto das fitas uma estrutura cristalina estável e insolúvel.

Por sua vez, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos altamente diversificados de parede celular de plantas formados por resíduos de açúcares monoméricos, que podem ser xilose, manose, galactose ou glicose, unidos por ligações do tipo β na cadeia principal. Em gimnospermas predominam as cadeias principais de β -manana, enquanto em dicotiledôneas predominam xiloglucanos. Já em monocotiledôneas, os β -xilanos são os principais constituintes da hemicelulose (KING *et al.*, 2011). Geralmente a cadeia principal é substituída nas posições dos carbonos 2 e 3 por resíduos de açúcares ou outros grupamentos químicos (THORSHEIM *et al.*, 2015). Então, o termo xilano agrega diferentes heteropolissacarídeos, cuja cadeia principal é constituída por resíduos do monossacarídeo xilose. A xilose é um polihidroxialdeído de cinco carbonos (aldopentose) encontrada mais comumente na natureza em sua configuração piranosídica (Figura 3.4) (THORSHEIM *et al.*, 2015). A cadeia β -(1-4)-xilano é mais flexível que a da β -(1-4)-celulose, porque apenas uma ligação de hidrogênio é formada entre os resíduos xilosil adjacentes, enquanto na celulose duas ligações de hidrogênio são formadas (DERVILLY-PINEL; THIBAUT; SAULNIER, 2001).

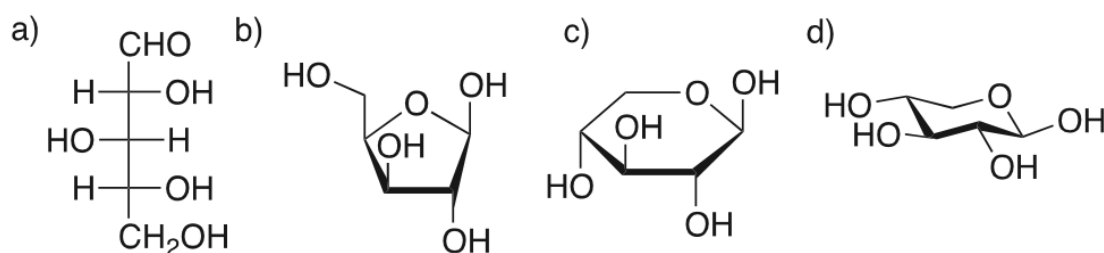


Figura 3.4: Diferentes representações da D-xilose. **(A)** Estrutura aberta. **(B)** β -D-xilofuranose, projeção de Haworth. **(C)** β -D-xilopiranosose, projeção de Haworth. **(D)** β -D-xilopiranosose, conformação em cadeira. Figura extraída e adaptada de Thorsheim et al. 2015.

Conjuntamente, os diferentes tipos de xilanos somam um terço de todo o carbono renovável do planeta. Portanto, representam uma fonte substancial de nutrição e muitas bactérias são capazes de degradar esse substrato. Esses micro-organismos xilanolíticos são encontrados em diversos nichos ecológicos, em regiões de decomposição de matéria orgânica de plantas, como solo, ambientes aquáticos e o trato digestivo de animais. Além dos decompositores, bactérias fitopatogênicas também apresentam atividade xilanolítica. A hidrólise microbiana da parede celular vegetal em seus açúcares constituintes é um dos principais mecanismos responsáveis pela utilização do carbono orgânico na biosfera.

Como consequência de ser o maior constituinte do xilano, a xilose é um dos monossacarídeos mais abundantes no planeta. A xilose também é conhecida como açúcar de madeira, por ter sido isolada de madeira em 1886. Embora possua essa origem, a xilose também é encontrada em estruturas da superfície celular de mamíferos e como componentes de matriz extra-celular, principalmente na constituição dos proteoglicanos. Proteoglicanos são grandes macromoléculas que consistem em um núcleo protéico decorado por grandes cadeias de carboidratos, os glicosaminoglicanos. A adição de uma xilose a um resíduo de serina na parte protéica do proteoglicano é a primeira etapa para criar um ponto de ramificação a partir do qual o glicosaminoglicano é alongado (THORSHEIM *et al.*, 2015).

Em bactérias, a xilose participa da constituição de metabólitos secundários naturalmente glicosilados, como benanomicinas e pradimicinas (anti-fúngicos), *enediynes* (porção apoprotéica que participa do reconhecimento da fenda menor do DNA e aparentemente faz parte de um mecanismo de resistência a auto-sacrifício), indóis (precursores de alcalóides), macrolactamas (anti-fúngicos, antibióticos, antivirais) e de alguns

lipídeos e peptídeos que também se originam no metabolismo secundário (ELSHAHAWI *et al.*, 2015).

Endo-1,4- β -Xilano hidrolases (EC 3.2.1.8), ou somente “xilanases”, são protagonistas do repertório de enzimas que degradam a hemicelulose, pois elas catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 que unem resíduos de xilose da cadeia principal produzindo xilo-oligossacarídeos. No xilano, as posições O-2 e/ou O-3 das unidades de xilose podem ser substituídas por radicais acetil e arabinofuranosil (Figura 3.5). Além deles, também o ácido 4-O-metil-D-glicurônico (4-O-MeGlcA) pode estar ligado à molécula de xilose, exclusivamente por meio de ligação do tipo α -1,2. A frequência e a quantidade de substituições na molécula de xilose da cadeia principal variam entre as espécies vegetais. Por exemplo, o termo arabinoxilano se refere a uma cadeia principal de resíduos de xilose unidos por ligações β -(1-4) em que predominantemente substituintes α -L-arabinofuranosil são ligados por meio de O-2 e/ou O-3. Vale a pena mencionar ainda sobre a constituição da hemicelulose que resíduos de ácido ferúlico podem esterificar os resíduos arabinofuranosil em O-5, fazendo ligações cruzadas com a lignina (DODD; CANN, 2009; PELL *et al.*, 2004).

Dada a diversidade de composição, para a degradação completa do xilano aos seus constituintes monoméricos, as unidades laterais arabinofuranosil e acetil devem ser removidas do polissacarídeo por arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) e acetil-xilanoesterases (EC 3.2.1.72), respectivamente (Figura 3.5). Além disso, α -glicuronidases (EC 3.2.1.139), que liberam o 4-O-MeGlcA, atua em xilo-oligossacarídeos em que a xilose da extremidade não-redutora é decorada com esse ácido (HESPELL; COTTA, 1995; PELL *et al.*, 2004). Por fim, 1,4- β -xilosidases clivam a extremidade não-redutora de xilo-oligossacarídeos produzindo xilose livre.

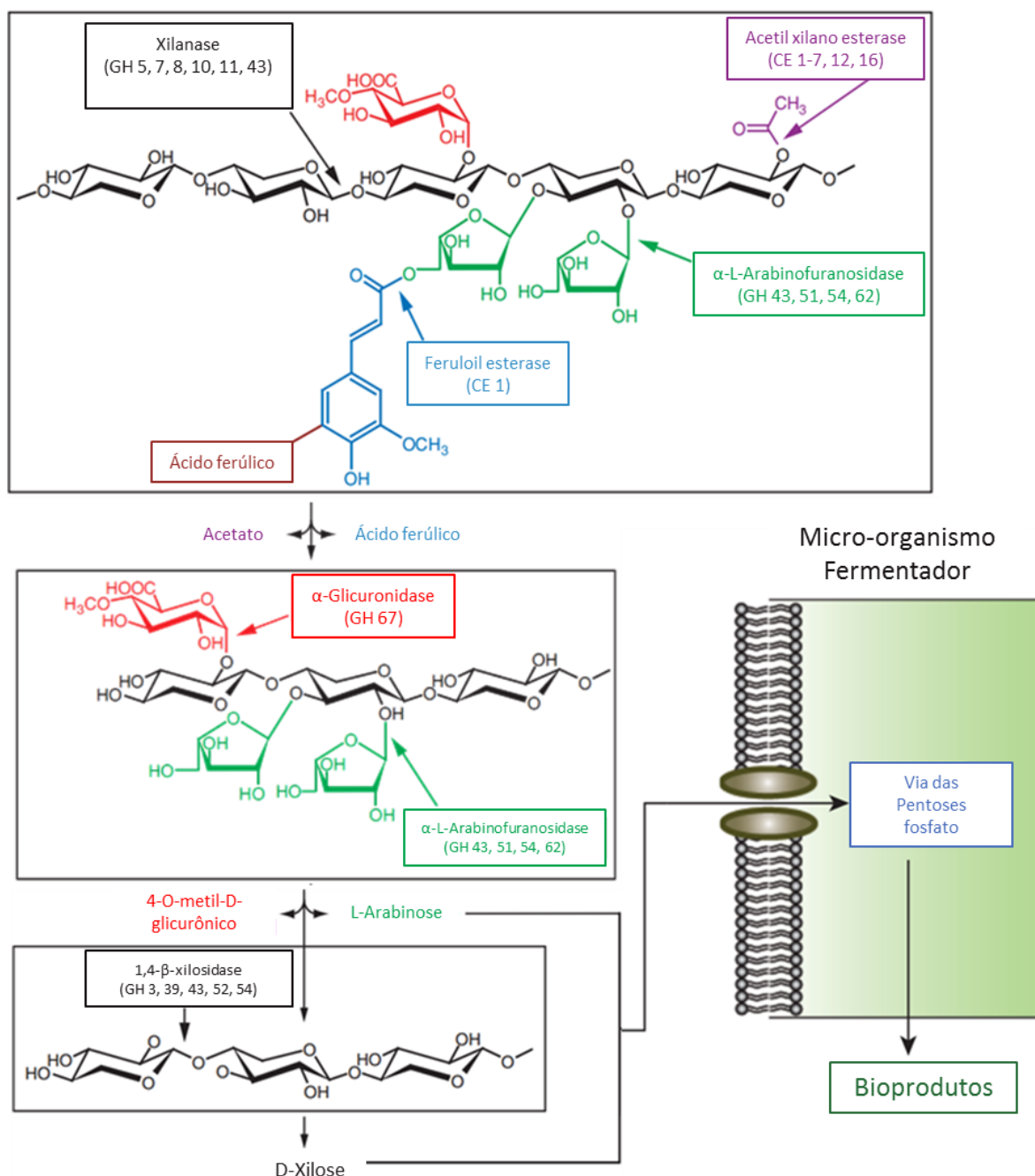


Figura 3.5: Esboço esquemático de um trecho de uma molécula hipotética de xilano e a ação de hidrolases para a sacarificação aos monômeros constituintes. A figura ressalta também que os monossacarídeos podem ser consumidos após a hidrólise. Na natureza, a hidrólise visa a nutrição do micro-organismo ou a desconstrução da parede vegetal para o ataque de patógenos, enquanto a biotecnologia busca hidrolases eficientes para que os monossacarídeos possam ser fermentados com alto rendimento, por exemplo, para a produção de bioetanol ou outro químico com valor agregado, geralmente ácidos orgânicos e álcoois. Figura extraída e adaptada de Dodd & Cann (2009). Em preto estão representados os resíduos de xilose, em vermelho ácido 4-O-metil-D-glicurônico, em verde a arabinose, em azul o ácido ferúlico e em roxo o radical acetil.

O banco de dados *Carbohydrate-Active Enzymes* (CAZy database; <http://www.cazy.org>) classifica em famílias de acordo com sequência primária enzimas que hidrolisam, sintetizam, e modificam de alguma forma poli- ou oligossacarídeos. A similaridade de sequência consequentemente faz com que enzimas da mesma família possuam prováveis características bioquímicas e enovelamento típicos de cada grupo. Nessa classificação, xilanases são encontradas comumente nos grupos 5, 7, 8, 10, 11, 30 e 43. A grande maioria das sequências já caracterizadas está concentrada nas famílias GH10 e GH11. As famílias se distinguem por várias propriedades físico-químicas e bioquímicas. Enzimas GH10 se enovelam com o dobramento $(\alpha/\beta)_8$, conhecido também como TIM barril, e tipicamente possuem massa molecular em torno de 40 kDa (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

A clivagem de ligações glicosídicas por enzimas é realizada por meio de catálise ácida e requer dois resíduos de aminoácidos: um doador de prótons e um nucleófilo (base) (Figura 3.6). Essa hidrólise ocorre mais comumente por meio de dois mecanismos que são diferenciados pela retenção ou pela inversão da configuração do carbono anomérico da extremidade redutora do oligossacarídeo produzido (Figura 3.6). Em ambos os mecanismos a posição do doador de prótons é idêntica, perto o suficiente para formar uma ligação de hidrogênio com o oxigênio glicosídico. Em enzimas que retêm a configuração, a base nucleofílica da catálise é vizinha do carbono anomérico do açúcar. As enzimas que invertem a configuração diferem justamente na distância dessa base, que é mais distante do alvo no substrato. Nesse caso, uma molécula de água pode se acomodar no espaço entre o nucleófilo e o açúcar (DAVIES; HENRISSAT, 1995; KOSHLAND, 1953).

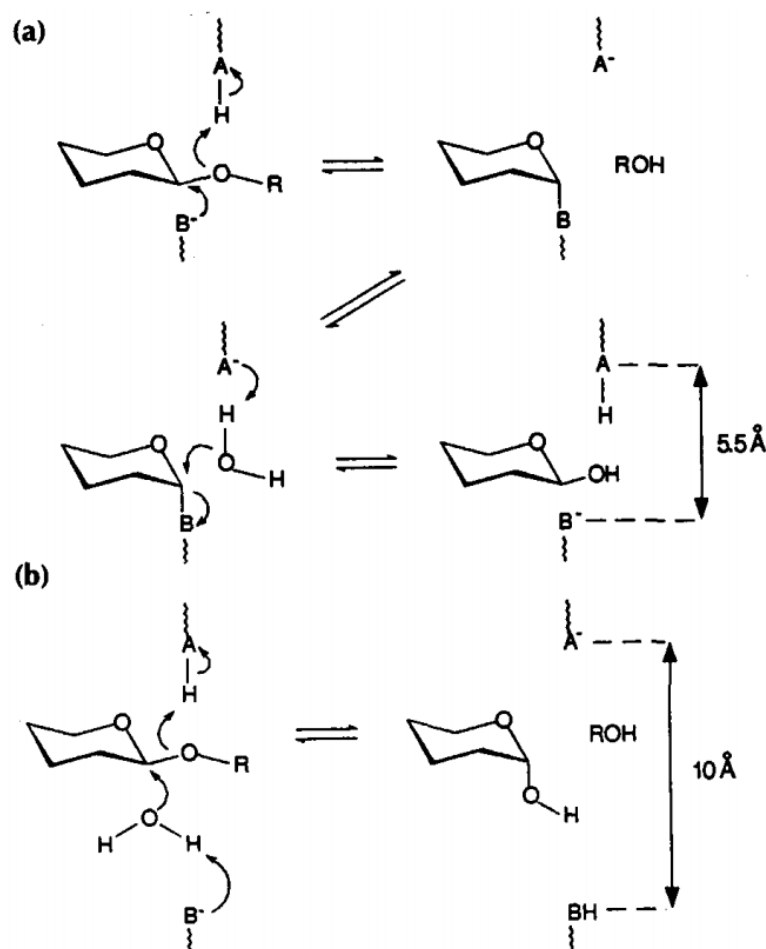


Figura 3.6: Os dois principais mecanismos de hidrólise de ligações glicosídicas. (a) O mecanismo de retenção, em que a base B^- promove um ataque nucleofílico no carbono anomérico, e em seguida oxigênio da ligação glicosídica é protonado pelo catalisador ácido (AH). A glicosil-enzima resultante é hidrolisada por uma molécula de água e a segunda substituição nucleofílica no carbono anomérico gera um produto com a mesma estereoquímica do substrato. (b) O mecanismo de inversão, em que a protonação do oxigênio glicosídico e a partida da aglicona são acompanhados pelo ataque concomitante de uma molécula de água que é ativada pelo resíduo básico. Essa etapa única de substituição nucleofílica gera um produto com estereoquímica oposta à do substrato (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

As famílias GH10 e GH11 possuem dois resíduos de glutamato que fazem a catálise pelo mecanismo de retenção da configuração (Figura 3.7). Na primeira etapa da reação, ocorre o ataque nucleofílico de um resíduo de glutamato (base/nucleófilo) ao carbono anomérico. Simultaneamente um segundo resíduo de glutamato (ácido/base) protona o oxigênio da ligação glicosídica e então é formado o estado de transição que resulta na partida do produto da extremidade redutora e na formação de uma enzima glicosilada intermediária (glicosil-enzima). Na segunda etapa, o resíduo de glutamato que provocou a protonação do oxigênio

da ligação glicosídica age como uma base promovendo um ataque nucleofílico para retirar um próton de molécula de água, que então ataca o carbono anomérico da glicosil-enzima intermediária. Dessa forma uma segunda substituição nucleofílica ocorre originando um produto de configuração β , a mesma do substrato (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

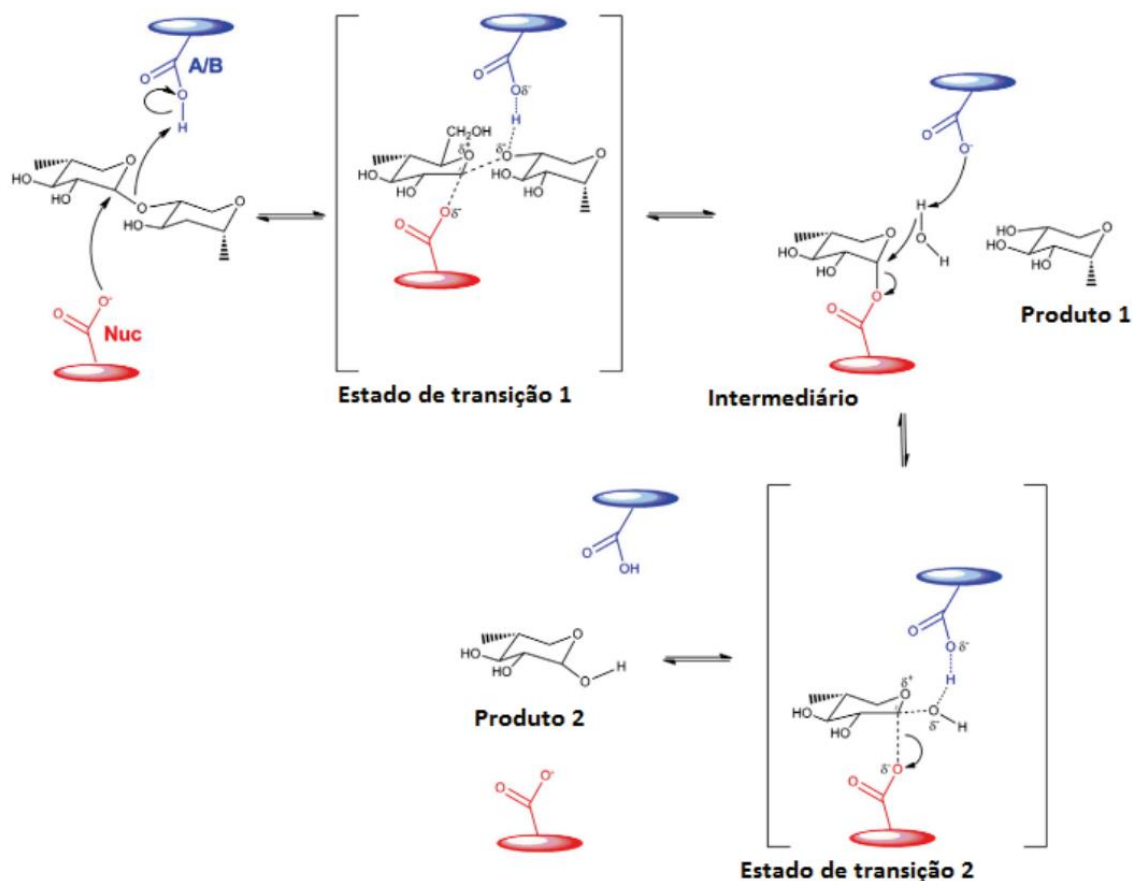


Figura 3.7: Mecanismo detalhado de retenção da configuração para hidrólise de uma ligação covalente O-glicosídica. A glicosil-enzima resultante (Intermediário) é hidrolisada por uma molécula de água e a segunda substituição nucleofílica no carbono anomérico gera um produto com estereoquímica idêntica àquela do substrato. Adaptação de Paës *et al.* (2012). Reproduzido (HOFFMAM, 2013).

As famílias GH10 e GH11 se diferenciam também fundamentalmente na quantidade de sub-sítios que possuem para se ligar ao substrato e em quais deles são capazes de acomodar resíduos de xilose com substituições. A família GH11 apenas hidrolisa regiões não decoradas da molécula de xilano, enquanto as enzimas da família GH10 possuem arquiteturas diferenciadas no sítio ativo que permitem acomodar substituições na cadeia principal. Por exemplo, a xilanase GH10 Xyn10B de *Cellvibrio mixtus* é capaz de hidrolisar de modo eficiente moléculas de xilano decoradas. Os resíduos de xilose dos sub-sítios +4, +3, +1

e -3 permitem a acomodação de 4-O-MeGlcA, por meio da exposição ao solvente do grupo O-2 da xilose (Figura 3.8). Além disso, o ácido urônico realiza ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com a enzima no sub-sítio +1, indicando que os resíduos decorados são alvo desse sub-sítio. Grupamentos arabinosil são acomodados pelo sub-sítio -2 (PELL *et al.*, 2004). Enzimas da família GH11 por sua vez, são capazes de acomodar substituições apenas a partir do sub-sítio +2 (DODD; CANN, 2009).

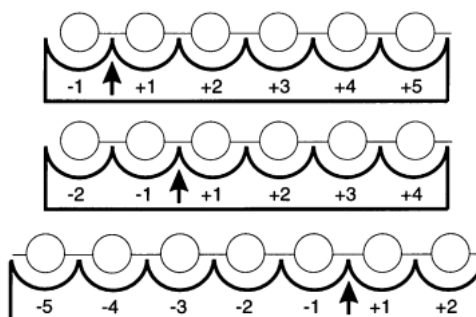


Figura 3.8: Explicação da nomenclatura para sub-sítios de ligação ao carboidrato em glicosídeo hidrolases. Por convenção a extremidade não-redutora do substrato é desenhada à esquerda e à direita é desenhada a extremidade redutora. Esse sistema numera os resíduos de açúcares de $-n$ a $+n$ a partir da extremidade não-redutora do polissacarídeo, com a clivagem ocorrendo na ligação entre os sub-sítios -1 e +1. A clivagem no desenho é indicada pela seta. Oligossacarídeos de diferentes tamanhos e clivagem em diferentes pontos é ilustrada para tornar clara a numeração. Essa nomenclatura foi proposta em 1997 por Gideon Davies, Keith Wilson e Bernard Henrissat, com o objetivo de unificar a nomenclatura entre enzimologistas e cristalógrafos, de modo a permitir a comparação entre diferentes enzimas. Figura adaptada de (DAVIES; WILSON; HENRISSAT, 1997).

3.5 Xilanases: a interação planta-patógeno

Não há razão mais contundente que justifica o estudo de enzimas degradadoras de polissacarídeos provenientes de micro-organismos fitopatogênicos do que o fato de todos os representantes desse grupo secretarem tais enzimas. Essas enzimas são universalmente produzidas por patógenos em grande e diverso número de especificidades, para clivar cada uma das ligações glicosídicas existentes em polissacarídeos como celulose, xilano e pectina.

Os patógenos secretam seu arsenal de enzimas de degradação inclusive durante os estágios iniciais do processo de infecção (ALBERSHEIM; JONES; ENGLISH, 1969). A digestão da parede celular por patógenos serve a múltiplos propósitos. Isso pode tanto aumentar a habilidade dos patógenos de penetrar no tecido vegetal quanto liberar nutrientes durante a

colonização das plantas (DÉJEAN *et al.*, 2013). Adicionalmente, foi reportado que a degradação da celulose e da hemicelulose pode capacitar bactérias limitadas ao xilema, como *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, de se mover de uma célula para outra fazendo espalhamento radial no hospedeiro (HU, JUN; QIAN; HE, 2007).

Endo- β -1,4-xilanases fúngicas foram caracterizadas quanto à sua capacidade de estimular reações de defesa em tomate e tabaco. Quando aplicadas nas folhas de tabaco ou tomate, xilanases induzem a biossíntese de etileno, a produção de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à necrose e morte celular (HR). As células vegetais reconhecem a presença de xilanases tanto diretamente, utilizando receptores para essas proteínas, quanto indiretamente, detectando os fragmentos de parede celular gerados pela atividade enzimática – os oligossacarídeos.

Enkerli e colaboradores (1999) mostraram para a xilanase II de *Trichoderma reesei* que a atividade dessa enzima não é responsável pela sua capacidade de ativar a resposta imune em tomate. Nesse trabalho, os autores provocaram a mutação dirigida do sítio ativo substituindo o resíduo de ácido glutâmico fundamental para a catálise. Mesmo com drástica redução da atividade xilanolítica, a enzima mutante ativou tanto a resposta de defesa do tomate quanto à tipo selvagem (ENKERLI, 1999).

Hanania & Avni demonstraram que existe um receptor na membrana plasmática de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. *xanthi*) que se liga à xilanase de *Trichoderma viride* causadora de necrose hipersensitiva nessa planta (HANANIA; AVNI, 1997). O mesmo grupo de pesquisa (FURMAN-MATARASSO *et al.*, 1999) também demonstrou que a atividade de hidrólise dessa enzima não é necessária para desencadear a resposta imune, utilizando uma estratégia experimental análoga à de Enkerli et al. (1999).

Em relação aos produtos da atividade enzimática, Palva e colaboradores (1992) estudaram o papel das enzimas pécticas de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* na infecção de tabaco por esse patógeno. Os autores demonstraram que tanto as enzimas, quanto extratos de polipeptato de sódio tratados previamente com uma endopoligalacturonase (oligossacarídeos pécticos), eram capazes de aumentar os níveis de expressão mRNA de genes ligados à resposta de defesa da planta (PALVA *et al.*, 1993).

Déjean e colaboradores (2013) realizaram estudos funcionais e genômicos visando a caracterização do arsenal de genes envolvidos com a utilização de xilano e xilose em *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc). O sistema xilanolítico de *X. campestris* pv. *campestris* compreende os *loci* *xytA*, *xytB* e *xylR* que contém enzimas para a degradação de xilano, metabolismo de xilose e ácido glicurônico, bem como transportadores de membrana interna e externa. Enzimas que compõem esse sistema são requeridas para a sobrevivência desse patógeno nas folhas das plantas. Dentre as três xilanases de *X. campestris* pv. *campestris* (duas da família GH10 e uma GH30), XYN10A que está localizada no *locus* *xytB* é responsável pela atividade xilanolítica extracelular detectável. Esses autores não detectaram atividade xilanolítica extracelular associada à XYN10C ou à XYN30A, embora essas duas enzimas também possuam peptídeos sinais para secreção. Genes desses *loci* foram especificamente induzidos por xilo-oligossacarídeos e reprimidos por XylR, um regulador da família LacI.

Todas as bactérias do gênero *Xanthomonas* possuem genes ortólogos que codificam enzimas da família GH10, embora com diferente número de cópias e organização. Desse modo, pode-se dividir esse gênero em três grupos. No primeiro, estão incluídas *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str. 306, *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *X. perforans*, que possuem três genes da família GH10 em um único operon (*xyn10A*, *xyn10B* e *xyn10C*). No segundo grupo estão *X. campestris* pv. *campestris*, *X. vesicatoria* e *X. gardneri*, que possuem dois genes dos três anteriormente relatados (*xyn10A* e *xyn10C*). O terceiro grupo inclui *X. oryzae* pv. *oryzae*, em que um conjunto diferente de duas xilanases está presente (*xyn10A* e *xyn10B*) (CHOW *et al.*, 2015).

Embora a importância de hidrolases glicosídicas para a interação planta-patógeno tenha sido amplamente demonstrada, os mecanismos moleculares dessa interação são elusivos. Do ponto de vista biológico, as enzimas de fitopatógenos constituem uma grande fonte de bioprospecção pouco explorada e promissora, com potencial já demonstrado, como exemplificado para fungos fitopatogênicos (KING *et al.*, 2011).

4 – METODOLOGIA

4.1 Clonagem, mutagênese e produção das proteínas

O DNA genômico de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str. 306 foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti que integra o quadro do Laboratório Nacional de Biociências (CNPEM/ Campinas, São Paulo). Os genes *xynA* e *xynB* foram amplificados do DNA genômico de *X. citris* subsp. *citri* e seguiu-se as etapas padrões para clonagem em vetor de expressão (HOFFMAM, 2013; SAMBROOK; RUSSELL, 2001), com o auxílio dos primers descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Sequência dos *primers* construídos para a amplificação dos genes *xynA* e *xynB* a partir do DNA genômico de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str. 306, e para a construção do mutante L270R.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<i>xynA</i> F	5'- CATATGGCCGCATGCGGGACGCCC -3'
<i>xynA</i> R	5'- CTCGAGTTAAGCGGTCGCGGAGGGCACC -3'
<i>xynB</i> F	5'- CATATG GCACCACTGGCAGCGAC -3'
<i>xynB</i> R	5'- CTCGAGTCATGGCGCAGGTGTACCGG -3'
<i>xynA</i> L270R F	5'-CGATGTGTTGCCGCGCACCAAGGAAGGCC-3'
<i>xynA</i> L270R R	5'-GGCCTTCCTTGGTGCGCGGCAACACATCG-3'

Os genes foram clonados no vetor pGEM®-T (Promega, Madison, WI) e após confirmação da sequência os fragmentos foram digeridos e sub-clonados em vetor de expressão pET-28a(+) – Novagen (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Duas versões mutadas da proteína XynA foram obtidas: a proteína mutada XynA Leu270Arg (L270R) e a proteína XynA quimérica. A modificação no gene *xynA* para originar a proteína com a mutação pontual Leu270Arg (L270R) foi obtida pela técnica de mutagênese sítio dirigida *in vitro* utilizando o QuickChange kit (Stratagene, La Jolla, CA), seguindo as recomendações do fabricante (Tabela 4.1). Já a XynA quimérica, em que a sequência de 26 resíduos de aminoácidos ²⁷⁵TKEGQIIGTGMAHKQFQLPEFKRFL³⁰⁰ da XynA nativa foi substituída pela construção SVWNLPTAEVSTRFEYKPER, foi sintetizada pela empresa GenScript (Piscataway, NJ). A sequência que substitui a região nativa de XynA foi selecionada em uma xilanase

genuína disponível em nosso laboratório - a proteína original pode ser acessada no GenBank (GenBank: AGS42204.1). XynA, XynB e proteínas mutadas foram expressas em células de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pRARE2, além do plasmídeo pET28a contendo a sequência codificadora da proteína correspondente. A indução da expressão ocorreu após a densidade óptica do cultivo celular atingir absorvância a 600 nm igual a 0,6, com a adição de 0,5 mM de IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo), *overnight* a 30 °C. As células foram então centrifugadas por 20 min a 7000 x *g* e o precipitado de células foi ressuspenso em tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, PMSF 1mM e 5 mM de benzamidina), contendo 80 μ g/mL de lisozima. A lise procedeu em gelo durante 30 min e, após esse tempo, as células foram submetidas à sonicação para liberar o conteúdo celular. O lisado foi novamente centrifugado a 16000 x *g* por 30 min e as proteínas-alvo presentes no sobrenadante foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel-*sepharose* seguida de cromatografia de exclusão molecular. Na cromatografia de afinidade foi utilizada uma coluna HiTrap Chelating HP de 5 mL (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) carregada com Ni²⁺ acoplada ao sistema Äkta purifier (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Foi utilizado gradiente não-linear de imidazol (0 - 0,5 M) para eluir as proteínas. As frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), concentradas por filtração e submetidas à cromatografia de exclusão molecular. A exclusão prosseguiu em coluna Superdex HiLoad 16/600 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,5 150 mM de NaCl, novamente acoplada ao sistema Äkta. A homogeneidade da solução obtida de proteína foi avaliada por SDS-PAGE e, quando necessário, por espalhamento dinâmico de luz (DLS).

4.2 Ensaio enzimáticos

Os testes de atividade enzimática que serão descritos a seguir foram feitos em reações avolumadas para 100 μ L, combinando nesse volume as quantidades necessárias de tampão, enzima, substrato e outros modificadores da atividade enzimática, quando necessário. Após incubar a reação por tempo e temperatura apropriados, adicionou-se 100 μ L do reagente de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Essa mistura foi então aquecida a 95 °C, por 5 min. Alíquotas de 100 μ L foram retiradas para leitura da absorvância a 540 nm. A quantidade de açúcares foi estimada com base em uma curva padrão construída com xilose (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi

definida como a quantidade de enzima necessária para liberar na reação 1 μmol de xilose por minuto.

Os ensaios de atividade foram feitos a 35 °C em tampão fosfato de sódio 40 mM pH 6,0 para XynA e mutantes (L270R e quimera). Para XynB, foi utilizado o tampão MES (ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) 40 mM pH 6,0, em ensaios conduzidos também a 35 °C. As curvas de temperatura foram conduzidas nos tampões mencionados, variando-se a temperatura de incubação da reação entre 5 e 60 °C. Exclusivamente nos ensaios de curva de pH, foi utilizado o tampão fosfato-citrato 0,1 M adicionado de glicina 0,1 M com o pH corrigido para o valor testado na faixa entre 2,0 e 10,0. A atividade das enzimas foi testada nos seguintes substratos: xilano *beechwood* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), arabinoxilano *rye* (Megazyme, Co. Wiclow, IE), arabinoxilano *wheat* (Megazyme, Co. Wiclow, IE), arabinogalactano *larch* (Megazyme, Co. Wiclow, IE), arabinana *sugar beet* (Megazyme, Co. Wiclow, IE), lichenano (Megazyme, Co. Wiclow, IE), xiloglucano (Megazyme, Co. Wiclow, IE), goma xantana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), manana (Megazyme, Co. Wiclow, IE), laminarina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), β -glucano (Megazyme, Co. Wiclow, IE) e carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

A influência do íon cálcio na atividade de XynB foi testada pela incubação em 1 mM de EDTA. Para testar a restauração da atividade com a presença de Ca^{2+} , a enzima foi incubada em 1 mM de EDTA e adicionada na reação contendo 10 mM de CaCl_2 . Os parâmetros cinéticos aparentes K_M e V_{MAX} foram calculados medindo-se a atividade em xilano *beechwood* na faixa de concentração de 0,25 a 24 mg/mL de substrato na reação. Os dados coletados foram calculados por meio da regressão não-linear de Michaelis-Menten, utilizando o programa GraphPad Prism 5. A XynA L270R, a XynA quimérica e XynB foram utilizadas nas reações nas seguintes concentrações finais: 20; 1,0 e 2,5 ng/ μL .

4.3 Análises de carboidratos

Os produtos da reação de hidrólise de xilano *beechwood* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e xilohexaose (Megazyme, Co. Wiclow, IE) foram identificados por eletroforese capilar de carboidratos acoplada à fluorescência induzida por laser (CE-LIF). Para tanto, os carboidratos foram derivatizados com ácido 8-aminopyreno-1,3,6-trissulfônico (APTS)

(EVANGELISTA; LIU; CHEN, 1995). Os experimentos de CE-LIF foram realizados em um aparelho P/ACE MDQ configurado com um sistema de detecção de fluorescência induzida por laser (Beckman Coulter, Brea, CA). O capilar foi condicionado com fosfato de sódio 100 mM pH 2,5 e as amostras foram injetadas aplicando-se a pressão de 0,5 psi por 5 s. As condições da eletroforese foram 20 kV/70-100 mA com polaridade reversa em temperatura controlada a 25 °C. Os oligossacarídeos marcados com APTS foram excitados a 488 nm e a emissão foi coletada através de um filtro de 520 nm. Os picos resultantes foram identificados pela comparação com padrões de xilose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e xilooligossacarídeos (Megazyme, Co. Wiclów, IE).

A análise quantitativa de carboidratos foi feita em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de troca aniônica (HPAEC), utilizando um equipamento Dionex ICS-3000 com um detector amperométrico pulsado e uma coluna CarboPac PA1 (4 x 250 mm). As amostras foram submetidas a uma taxa de vazão de 0,5 mL/min usando um gradiente de 0-500 mM de acetato de sódio em 100 mM de NaOH. Os picos eluídos foram comparados com o tempo de retenção e as concentrações de soluções preparadas com padrões de xilose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e xilooligossacarídeos (Megazyme, Co. Wiclów, IE).

4.4 Experimentos de espectroscopia e calorimetria

Espectros de dicroísmo circular no UV-distante foram coletados com o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co. Ltd., Tokyo, Japan). Amostras foram diluídas para a concentração de 10 µM em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,5 (XynA, XynA L270R e XynA quimérica) ou em tampão cacodilato de sódio 20 mM pH 6,5 (XynB). Experimentos de desnaturação foram monitorados em 220 nm. Para os experimentos de desnaturação térmica, a amostra foi aquecida 1°C/ min de 20 a 90°C.

Medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram feitas em um microcalorímetro VP-DSC (MicroCal) usando uma taxa de aquecimento de 1°C/min em temperaturas de 20 a 90°C. A concentração de proteína foi variada de 1,0 a 2,0 mg/mL para XynA, XynB e mutantes. XynB foi analisada na presença de 5 mM de EDTA ou com 20 mM de CaCl₂ para estudar o efeito dos íons Ca²⁺ na estabilidade da proteína. Os termogramas obtidos para cada amostra foram analisados subtraindo-se a medida do tampão e normalizando-se

pela concentração utilizada. O dado final foi então ajustado por regressão não-linear utilizando o método dos mínimos quadrados onde o pico da endotérmica significa o valor de T_m , temperatura de transição.

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para XynB com íons Ca^{2+} foram realizados em um microcalorímetro VP-ITC a 20°C. A amostra de proteína foi extensivamente dialisada em tampão cacodilato de sódio 20 mM pH 6,5 e sua concentração foi ajustada para 100 μM . A solução do ligante foi preparada na concentração final de 1 mM no tampão de diálise. A constante de afinidade (K_a) foi estimada do melhor ajuste (um sítio de ligação) da curva de titulação utilizando o programa NITPIC (KELLER *et al.*, 2012).

4.5 Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)

Coletas e análises de dados de SAXS foram feitas para determinar o estado e o arranjo oligomérico das proteínas em solução. As medidas de SAXS foram coletadas com as proteínas em diferentes concentrações (2, 4 e 6 mg/mL) em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Os dados foram obtidos nas linhas de luz síncrotron SAXS1 e SAXS2 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). Os padrões de SAXS foram integrados utilizando o programa Fit2D. Os dados foram analisados utilizando o programa GNOM (SVERGUN, D I, 1992). Os envelopes moleculares foram calculados utilizando os dados experimentais de SAXS no programa DAMMIN (SVERGUN, D I, 1999). Um mínimo de dez corridas independentes utilizando a modelagem *ab initio* originaram modelos de envelope muito similares (valores discrepância espacial normalizada – NSD < 1). O modelo geométrico médio desses envelopes foi então calculado utilizando o pacote DAMAVER (VOLKOV; SVERGUN, 2003). As curvas de espalhamento teóricas das estruturas cristalográficas foram calculadas e comparadas com as curvas experimentais de SAXS utilizando o programa CRY SOL (SVERGUN, D.; BARBERATO; KOCH, 1995). As estruturas cristalográficas foram modeladas dentro dos envelopes de SAXS correspondentes utilizando o programa SUPCOMB (KOZIN; SVERGUN, 2001).

4.6 Cristalografia de raios X

As proteínas foram cristalizadas pelo método de difusão de vapor em gota sentada utilizando as instalações automatizadas de cristalização de macromoléculas do LNBio-CNPq. XynA foi cristalizada em dois diferentes grupos espaciais, $P2_1$ e $P4_32_12$, usando as seguintes

soluções: tris-HCl 0,1 M pH 8,0 com 12% (m/v) de polietilenoglicol 6000 e tris-HCl 0,1 M pH 9,0 com 6% (m/v) de polietilenoglicol 6000 e 5% (v/v) de glicerol (v/v), respectivamente. Os cristais de XynB foram obtidos em uma solução composta por 50 mM de fosfato monobásico de potássio e 14% (v/v) de polietilenoglicol 8000. A derivatização de XynB com iodo foi preparada submergindo um cristal único em uma solução contendo 20% (v/v) de glicerol e 500 mM de cloreto de iodo por 1 min. Os complexos de XynB com xilose, xilobiose e xilotriose foram preparados submergindo os cristais na solução mãe em que foram obtidos adicionada de 10 mM do respectivo xilooligossacarídeo (Megazyme, Co. Wiclow, IE) durante 30 min. As intensidades das difrações foram coletadas com o auxílio de detector CCD (MarMosaic225) na linha de luz MX2 (LNLS, Campinas, Brasil). A análise dos padrões de difração e a obtenção das estruturas cristalográficas foi feita em colaboração com a Dra. Camila R. Santos.

4.7 Hidrólise de licor rico em xilo-oligossacarídeos

A fim de testar a performance das enzimas estudadas neste trabalho em um substrato de real interesse biotecnológico, optou-se por fazer testes de hidrólise do licor rico em xilo-oligossacarídeos proveniente do pré-tratamento hidrotérmico da cana-de-açúcar. Para tanto, foi executado um delineamento composto central rotacional (DCCR) seguindo a metodologia da superfície de resposta, para XynA quimérica e XynB. As variáveis independentes analisadas foram concentração de xilo-oligossacarídeos (g/L) ($k=1$) e concentração de enzima (mg/mL) ($k=2$) com três pontos centrais totalizando 11 ensaios (Tabela 4.2). Para prever o ponto ótimo, uma função polinomial foi ajustada com os resultados experimentais obtidos:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$$

onde Y é a resposta predita (concentração de xilose); X_1 e X_2 são as formas codificadas das variáveis analisadas (concentração de xilo-oligossacarídeos e concentração de enzima, respectivamente); b_0 é uma constante; b_1 e b_2 são os coeficientes lineares; b_{12} é o coeficiente de interação entre as variáveis independentes; b_{11} e b_{22} são os coeficientes quadráticos. Os ensaios foram avolumados para o total de 1 mL e a reação procedeu em pH 6,0 incubando-se os microtubos de ensaio em um Eppendorff Thermomixer® Comfort a 35 °C por 24 horas, sob agitação constante de 700 rpm. Após o período de incubação as amostras foram aquecidas a 80 °C por 20 minutos para a inativação térmica das enzimas e então a xilose liberada foi quantificada por HPLC, conforme descrito previamente no item 4.3. As análises

relacionadas com essa metodologia foram executadas utilizando o software STATISTICA (versão 8.0/ Statsoft). Vale a pena mencionar que como o objetivo desse teste era quantificar xilose monomérica, além das xilanases testadas foi também adicionada em proporção de 1:1 em cada um dos ensaios uma β -xilosidase purificada, a Xyl455 de *Sphingobacterium* sp. HP455. O licor de xilo-oligossacarídeos utilizado neste trabalho, originado do tratamento hidrotérmico do bagaço da cana-de-açúcar, foi gentilmente cedido pela pesquisadora Dra. Sarita C. Rabelo, do grupo de estudos de pré-tratamentos físico-químicos do CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol).

Tabela 4.2: Desenho experimental para otimização da hidrólise enzimática do licor de xilo-oligossacarídeos. Os valores codificados do modelo estão indicados em parênteses.

Ensaio	Xilo-oligossacarídeos (g/L)	Enzima XynA quimérica ou XynB (mg/mL)
1	4,5 (-1)	0,3 (-1)
2	25,8 (1)	0,3 (-1)
3	4,5 (-1)	1,7 (1)
4	25,8 (1)	1,7 (1)
5	1 (-1,41)	1 (0)
6	30 (1,41)	1 (0)
7	15,5 (0)	0 (-1,41)
8	15,5 (0)	2 (1,41)
9	15,5 (0)	1 (0)
10	15,5 (0)	1 (0)
11	15,5 (0)	1 (0)

5 – RESULTADOS

5.1 XynA possui atividade de exo-oligoxilanase e produz xilose

A XynA de *X. citri* subsp. *citri* exibe similaridade de sequência significativa com endo- β -1,4-xilanases pertencentes à família GH10 bem caracterizadas na literatura como a CmXyn10B de *Cellvibrio mixtus* (PDBID: 1UQY; 45%) (PELL *et al.*, 2004) a IXT6 de *Bacillus stearothermophilus* (PDBID: 2Q8X; 40%) (SOLOMON *et al.*, 2007) e a PbXyn10B de *Paenibacillus barcinonesis* (PDBID: 3EMC; 39%) (GALLARDO *et al.*, 2010). Entretanto, em testes enzimáticos XynA não foi capaz de hidrolisar xilano (Figura 5.1), sugerindo que essa enzima não é uma xilanase convencional. Em estudos de mutantes pertencentes às espécies *X. campestris* pv. *campestris* (DÉJEAN *et al.*, 2013) e *X. oryzae* pv. *oryzae* (RAJESHWARI; JHA; SONTI, 2005), a deleção do gene codificador da XynA resultou em atividade xilanolítica inalterada em relação ao tipo selvagem, sugerindo que em outras espécies de *Xanthomonas* genes órtologos ao codificador da XynA não são responsáveis pela atividade xilanásica.

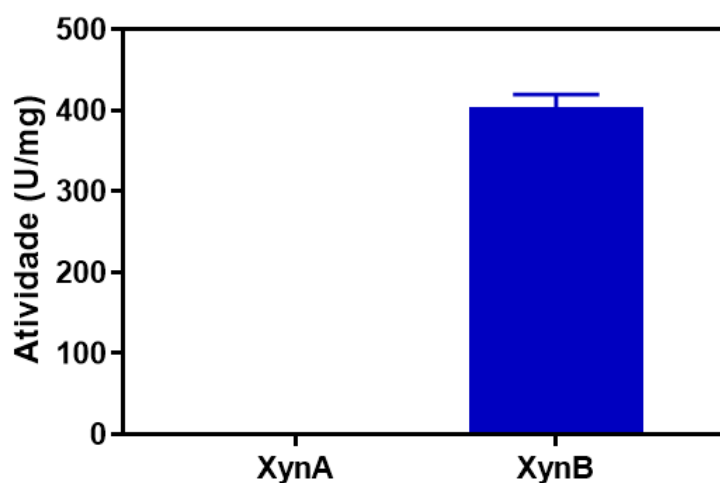


Figura 5.1: Atividade específica de XynA comparada com a própria xilanase canônica de *X. citri* subsp. *citri* (a atividade de XynB será discutida a seguir nesse trabalho). Essa reação foi feita utilizando xilano *beechwood* e a atividade apresentada foi calculada em termos de equivalentes de açúcares redutores totais, utilizando o método de DNS (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992; MILLER, 1959).

Entretanto, em testes de eletroforese capilar de carboidratos, essa enzima mostrou-se capaz de hidrolisar xilohexaose e xilo-oligossacarídeos (Figura 5.2). Nota-se que os principais produtos da hidrólise de X6 são xilopentaose (X5) e xilose. Esse padrão é diferente do resultado de endo-xilanases tradicionais, das quais se espera majoritariamente xilobiose, xilotriose e xilotetraose como produtos de reação (DIOGO *et al.*, 2015; HOFFMAM, 2013; SANTOS *et al.*, 2010). A presença de xilopentaose e xilose sugere atividade de exo-xilanase para essa enzima. Além disso, a complementação da atividade de XynB com a XynA aumentou em 50% a produção de xilose (Figura 5.3) e isso corrobora a hipótese de XynA produzir xilose a partir de xilo-oligossacarídeos com atividade exo e não ser uma endo-xilanase como sugere a análise de sua sequência primária.

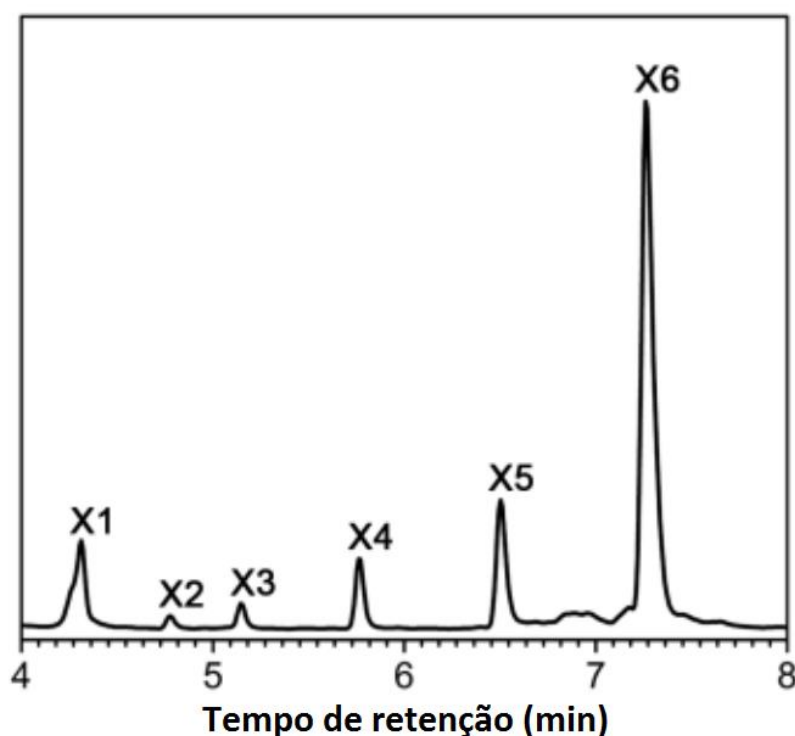


Figura 5.2: Eletroforese capilar de carboidratos (CE-LIF) para os produtos de hidrólise de xilohexaose por XynA. A reação de hidrólise foi conduzida em tampão fosfato de sódio 40 mM pH 6,5 com a enzima a 0,02 mg/mL e 8 mM de xilohexaose. Após a reação a marcação dos produtos com APTS seguiu conforme descrito previamente na metodologia (Item 4.3).

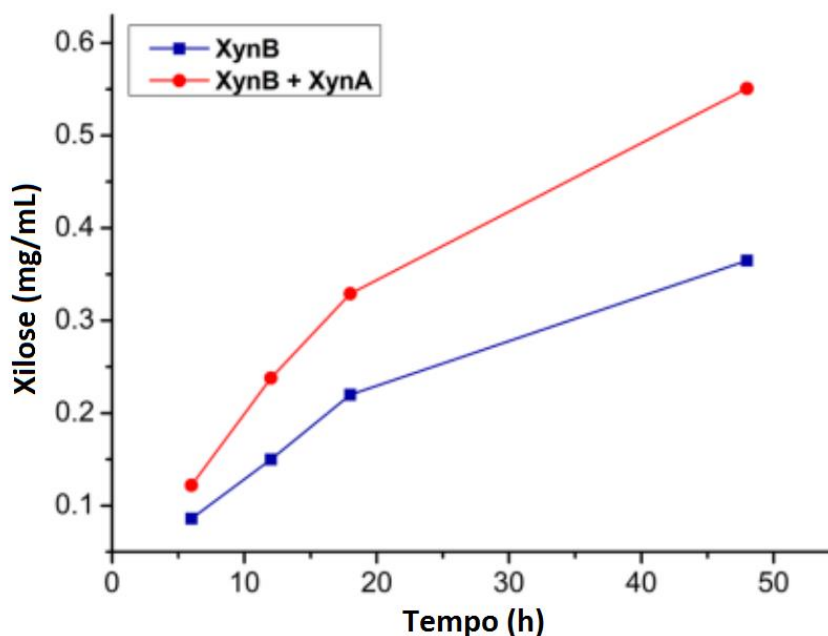


Figura 5.3: Xilose produzida a partir da hidrólise de xilano *beechwood* 3% utilizando XynB apenas (curva azul) ou XynB complementada com XynA (curva vermelha). XynA não produz xilose quantificável nas mesmas condições desse experimento (a partir de xilano). A xilose apresentada nesse resultado foi quantificada por meio de HPLC. As reações de hidrólise foram feitas em tampão fosfato de sódio 40 mM pH 6,5 a 35°C com as enzimas na concentração de 0,02 mg/mL.

Com o objetivo de esclarecer as bases moleculares de XynA que são responsáveis por essa notável incapacidade de hidrolisar xilano *beechwood*, estudos da estrutura tridimensional dessa enzima foram feitos utilizando as técnicas: difração de raios X para determinar a estrutura cristalográfica, espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS), que determina o envelope da proteína em solução, e espalhamento dinâmico de luz (DLS), que mede o tamanho e a distribuição do tamanho de moléculas em solução. Tanto nos cristais difratados quanto em solução, os resultados obtidos mostraram que XynA possui uma estrutura dimérica estável em sua forma nativa (Figuras 5.4 e 5.5).

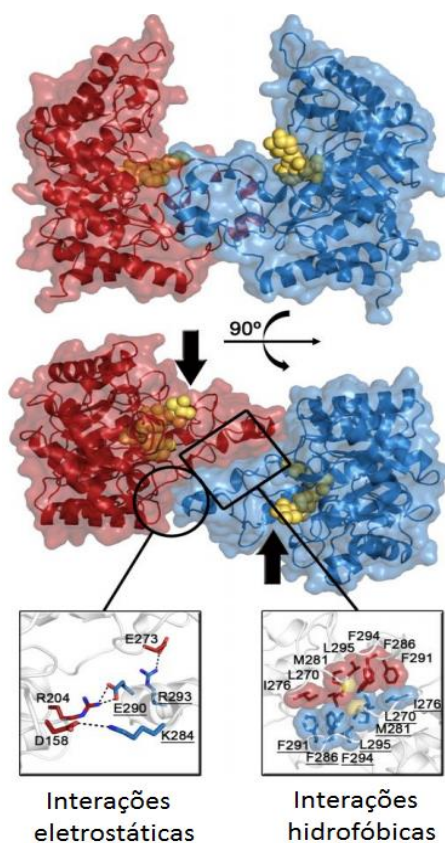


Figura 5.4: Estrutura do dímero da XynA. Diferentes pontos de vista são apresentados para destacar as interações hidrofóbicas e eletrostáticas que são responsáveis pela dimerização. Os sítios ativos são indicados pelas setas.

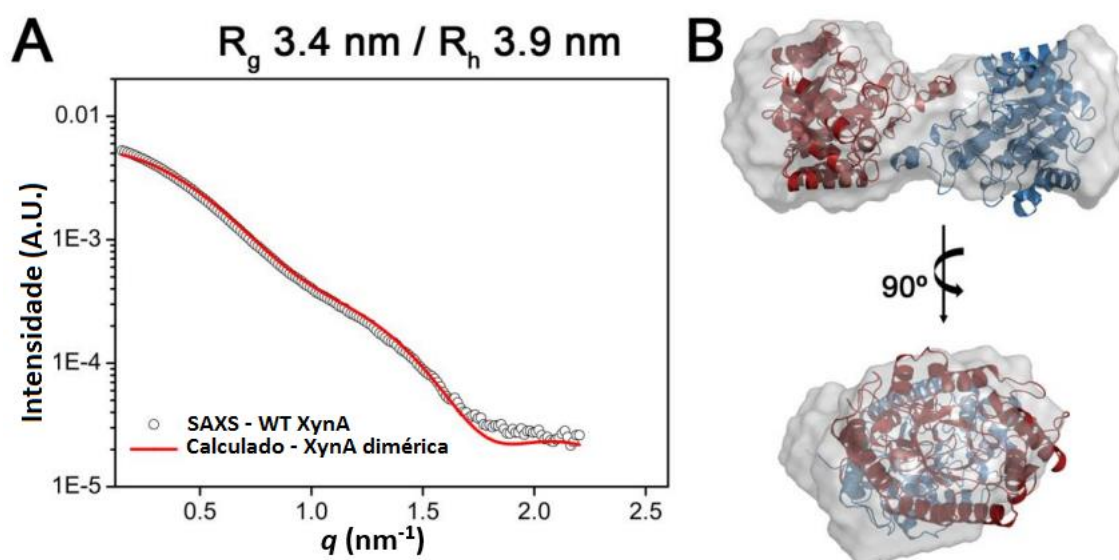


Figura 5.5: Análise de SAXS da XynA. (A) Curva de espalhamento experimental e curva calculada teórica para o dímero resolvido por cristalografia. (B) O dímero obtido por cristalografia montado dentro do envelope de baixa resolução fornecido pelo SAXS.

Essa configuração quaternária é estabilizada por uma alça que conecta os elementos topológicos $\beta 7$ e $\alpha 7$, o *loop* VLPLTKEGQIIIGTGMMAHKQFQLPEFKRFLDPYR DGLPAD, que é trocado entre as duas subunidades e estabelece interações iônicas e hidrofóbicas entre elas (Figura 5.6). Um conjunto de três resíduos aromáticos (Phe286, Phe291 e Phe294) forma o núcleo hidrofóbico da interface, enquanto as interações eletrostáticas estão presentes na região exposta ao solvente (Glu290-Arg204, Asp158-Lys284 e Glu273-Arg293) (Figura 5.4). O alinhamento com outras sequências mostra que todos os resíduos de aminoácidos considerados relevantes para a catálise e o reconhecimento do substrato são conservados em XynA, com exceção do *loop* $\beta 7$ - $\alpha 7$ que é observado apenas nos ortólogos de XynA pertencentes ao gênero *Xanthomonas* (Figura 5.6). O formato arquitetural em U do dímero com os sítios ativos de ambas subunidades frente a frente implica em uma barreira física na região aglicona pelo *loop* $\beta 7$ - $\alpha 7$ (Figuras 5.4 e 5.7A).

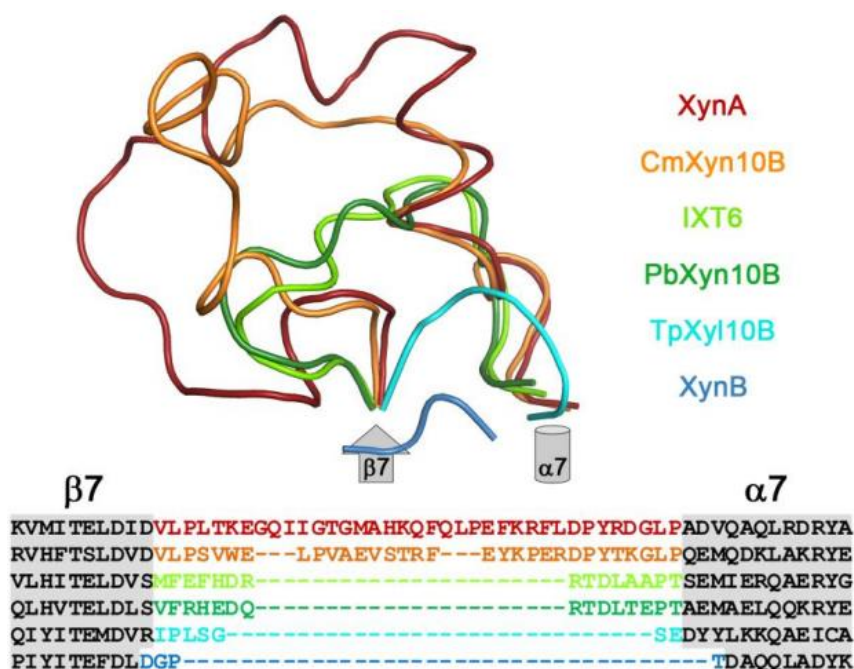


Figura 5.6: Arquitetura e composição em aminoácidos da alça $\alpha 7$ - $\beta 7$ de enzimas GH10 com estruturas já caracterizadas. XynA (PDBID: 4PMV, neste trabalho), CmXyn10B (PDBID: 1UQY) (PELL *et al.*, 2004), IXT6 (PDBID: 2Q8X) (SOLOMON *et al.*, 2007), PbXyn10A (PDBID: 3EMC) (GALLARDO *et al.*, 2010), TpXyl10B (PDBID: 3NIY) (SANTOS *et al.*, 2010) e XynB (PDBID: 4PMX, neste trabalho).

A comparação estrutural de XynA com outras xilanases da família GH10 complexadas com xilo-oligossacarídeos revela que os subsítios -2, -1 e +1 são altamente conservados nesse grupo de enzimas (Figura 5.7). Entretanto, na XynA o *loop* β 7- α 7 obstrui os sub-sítios positivos remanescentes. O sub-sítio +2 é totalmente bloqueado pois um resíduo de glutamina ocupa a posição do monômero glicosil (Figura 5.7C). Já os sub-sítios +3 e +4 são preenchidos pela cadeia principal do *loop* β 7- α 7 da outra subunidade da estrutura quaternária (Figuras 5.7A e 5.7C).

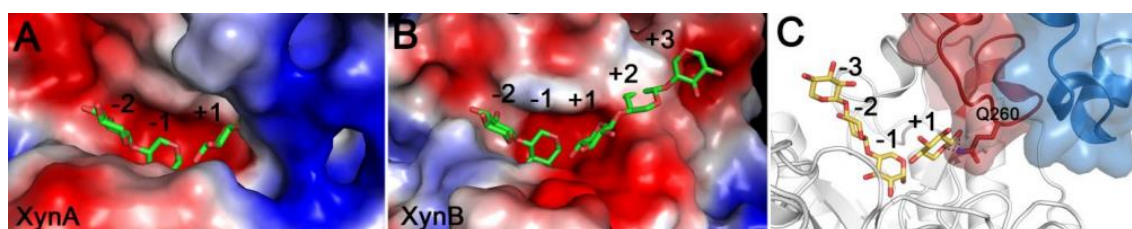


Figura 5.7: A alça de dimerização (*loop* β 7- α 7) bloqueia o sub-sítio +2 de XynA. Potencial eletrostático da superfície de XynA (A) e XynB (B). (C) O resíduo Q260, presente no *loop* β 7- α 7, provavelmente participa no reconhecimento do resíduo xilosil no sub-sítio +1 de XynA. Os xilo-oligossacarídeos mostrados foram modelados no sítio ativo de XynA (A e C) e XynB (B) baseando-se na estrutura de CmXyn10B (PDBID: 1UQY) (PELL *et al.*, 2004).

A estrutura dimérica com os sub-sítios positivos obstruídos juntamente com a caracterização do padrão de clivagem sugerem que XynA libera xilose a partir do terminal redutor do polissacarídeo. Até então esse modo de ação foi observado apenas para uma enzima GH8 (Rex) de *Bacillus halodurans* C-125 (HONDA; KITAOKA, 2004). Da mesma forma que ocorre com XynA, a maquinaria catalítica da Rex é conservada quando comparada com outras enzimas da família GH8, porém o sub-sítio +2 é bloqueado estericamente por uma alça que precede a hélice α 10 (FUSHINOBU *et al.*, 2005). Na proteína Rex, o resíduo His139 forma uma ligação de hidrogênio com o grupo β -hidroxil da xilose no sub-sítio +1, contribuindo para a especificidade de clivagem na extremidade redutora (FUSHINOBU *et al.*, 2005). Por analogia, o resíduo Gln260 parece desempenhar papel equivalente em XynA baseado em sua geometria. As descobertas experimentais descritas nesse trabalho combinadas com a notável similaridade ao mecanismo descrito para a Rex sugerem fortemente que XynA é uma exo-oligoxilanase que produz xilose clivando a extremidade redutora de moléculas de carboidratos.

5.2 Redesenho racional do loop $\beta 7$ - $\alpha 7$ de XynA

Duas proteínas mutadas foram construídas e caracterizadas utilizando como base a sequência nativa de XynA: XynA-L270R (uma mutação pontual) e uma quimera substituindo todo o *loop* $\beta 7$ - $\alpha 7$ por uma sequência conservada que existe em endo-1,4- β -xilanases típicas (Conforme descrito no item 4.1 da metodologia). Essas mutações foram feitas para investigar o papel do *loop* $\beta 7$ - $\alpha 7$ na estabilização da estrutura quaternária e no modo de ação diferenciado de XynA. A mutação pontual XynA-L270R foi suficiente para separar o dímero uma vez que o resíduo de arginina (R) foi inserido no núcleo hidrofóbico da interface causando forças repulsivas e impedimento estérico para a dimerização (Figura 5.8).

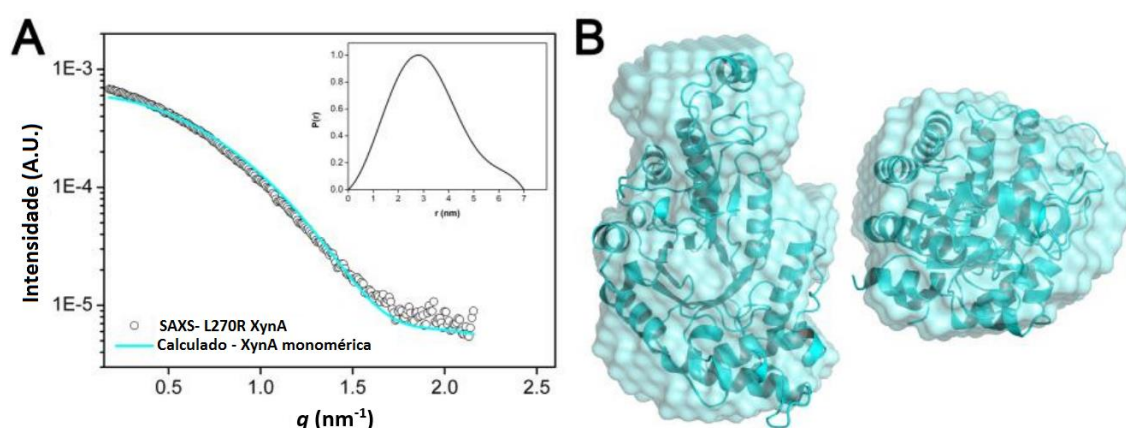


Figura 5.8: Análise de SAXS da proteína mutada XynA-L270R. (A) Curva de espalhamento experimental e curva calculada teórica para a proteína mutada XynA-L270R monomérica. (B) O modelo monomérico para a proteína mutada ajustado no envelope de SAXS.

Em relação à atividade, a proteína mutada XynA-L270R catalisa a hidrólise de xilano (Tabela 5.1 e Figura 5.9), porém com atividade catalítica muito baixa comparada com XynB (a xilanase típica de *X. citri* subsp. *citri* - esse resultado será apresentado a seguir). Os gráficos com a caracterização de pH e temperatura que suportam a caracterização cinética são mostrados na Figura 5.10. O padrão de clivagem de xilo-oligossacarídeos também se alterou, tornando-se um padrão canônico de endo-1,4- β -xilanases; isto é, com predominância de X2, X3 e X4 como produtos finais (Figura 5.11). Esse dado confirma que uma única mutação, que provocou o rompimento do arranjo dimérico, foi capaz de alterar o padrão de atividade de XynA de exo para endo.

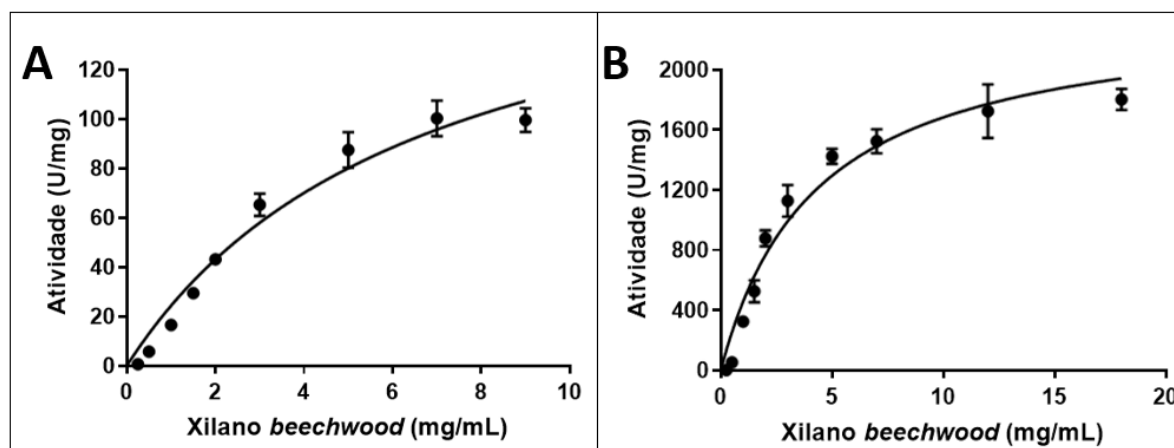


Figura 5.9: Perfis cinéticos das proteínas com mutação pontual XynA-L270R (A) e da XynA quimérica (B). Os ensaios de atividade foram realizados a 35°C em tampão fosfato pH 6,5 100 mM com a XynA-L270R a 0,02 mg/mL, 30 min de reação, e a quimera a 0,001 mg/mL, 15 min de reação. Todos os experimentos foram feitos com seis repetições em microplacas. R^2 XynA-L270R= 0,9599; R^2 quimera= 0,9495.

Tabela 5.1: Parâmetros cinéticos da hidrólise de xilano *beechwood* calculados para as duas proteínas geradas a partir de mutações em XynA. Valores para a XynA nativa são iguais a zero, uma vez que essa enzima não possui atividade mensurável no substrato utilizado.

<i>Parâmetro</i>	<i>XynA-L270R</i>	<i>XynA quimérica</i>
K_M (mg mL ⁻¹)	6.7 (±0,8)	4.3 (±0,4)
V_{MAX} (U mg ⁻¹)	185 (±0,3)	2400 (±0,1)
K_{cat} (s ⁻¹)	134 (±19)	1682 (±188)
K_{cat}/K_M (s ⁻¹ mg ⁻¹ mL)	20 (±4)	391 (±59)

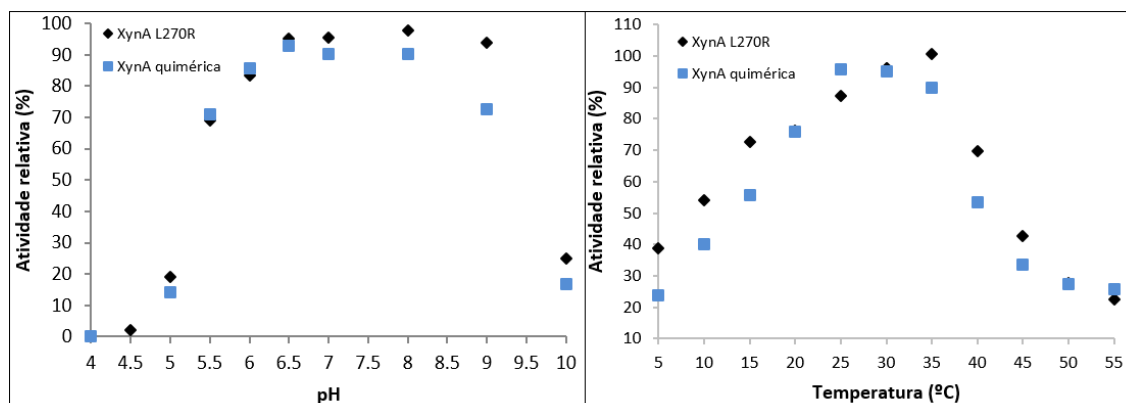


Figura 5.10: A influência do pH e da temperatura na atividade de XynA-L270R e na XynA quimérica. A atividade em diferentes pHs foi testada em tampão citrato-fosfato 40 mM adicionado de glicina 40 mM (faixa entre 4,0 e 10,0) a 35°C em xilano *beechwood* 0,5%. O efeito da temperatura na atividade foi testado em tampão fosfato de sódio 40 mM pH 6,5 também em xilano *beechwood* 0,5%. As curvas de concentração de enzima que foram feitas (resultados não-mostrados) permitiram padronizar as reações enzimáticas de XynA-L270R e da XynA quimérica em relação a concentração de proteína e tempo: 0,02 mg/mL, 30 min e 0,001 mg/mL, 15 min, respectivamente. Todos os experimentos foram feitos com seis repetições em microplacas.

Em contraponto à baixa atividade de XynA-L270R, a outra proteína mutada, a XynA quimérica, mostrou-se notavelmente e surpreendentemente mais eficiente na hidrólise de xilano que a própria XynB, a endo-1,4- β -xilanase nativa de *X. citri* subsp. *citri*. XynA quimérica é cerca de 20 vezes mais ativa que XynA-L270R e 15% mais ativa que XynB (Tabelas 5.1 e 5.4). A constante de eficiência catalítica da XynA quimérica (K_{cat}/K_M) é no mínimo sete vezes maior que os mesmos valores observados na literatura para outras endo-1,4- β -xilanasas mesofílicas da família GH10 como CmXyn10B (PELL *et al.*, 2004), Xyn10A de *Bacteroides xylanisolvens* (MIRANDE *et al.*, 2010) e XynA de *Glaciecola mesophila* (GUO *et al.*, 2009). Os dados cinéticos mostraram melhoria notável tanto no K_M quanto na V_{MAX} em comparação com o mutante pontual (Tabela 5.1).

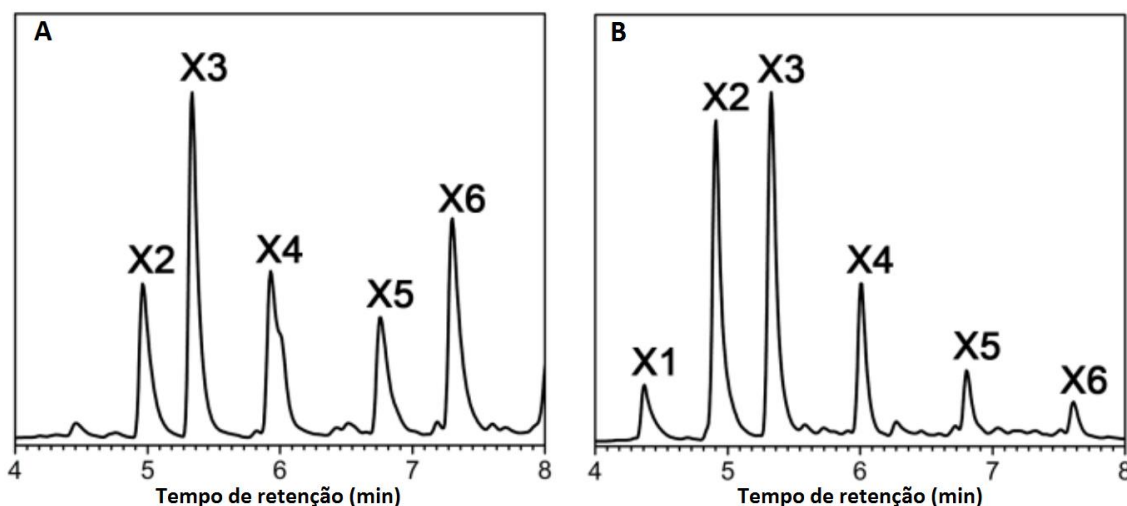


Figura 5.11: Eletroforese capilar de carboidratos (CE-LIF) para os produtos de reações de hidrólise feitas com XynA-L270R. (A) Produtos de hidrólise de xilano *beechwood*. (B) Produtos de hidrólise de xilohexaose. A reação de hidrólise foi conduzida em tampão fosfato de sódio 40 mM pH 6,5 com a enzima a 0,02 mg/mL e 8 mM de xilohexaose ou xilano *beechwood* 0,5%. Após a reação a marcação dos produtos com APTS seguiu conforme descrito previamente na metodologia (Item 4.3).

A eletroforese capilar de carboidratos confirmou que a substituição do *loop* converteu XynA em uma endo-1,4- β -xilanase clássica produzindo X2 e X3 tanto a partir de de xilano quanto de X6 (Figura 5.12). Os dados de SAXS coletados para essa proteína mutada mostram que a XynA quimérica é também um monômero em solução, corroborando a importância da acessibilidade aos sub-sítios positivos para a atividade endo-xilanolítica (Figura 5.13). Além disso, a caracterização bioquímica revelou para essa enzima atividade em uma ampla faixa de pH (6,0 a 9,0) e temperatura ótima de 35°C (Figura 5.10). Essas propriedades bioquímicas conjuntamente com a eficiência catalítica extremamente alta tornam essa enzima um biocatalisador potencialmente diferenciado para aplicações biotecnológicas em temperaturas moderadas.

Além das mudanças funcionais, as mutações também afetaram a estabilidade de XynA. Estudos de dicroísmo circular e calorimetria de varredura diferencial mostraram que a XynA-L270R possui temperatura de *melting* 10°C menor que a nativa enquanto a XynA quimérica apresentou 6°C de redução nesse mesmo parâmetro (Figura 5.14).

Os resultados da caracterização bioquímico-funcional, além das evidências biofísicas coletadas para as proteínas mutadas, confirmam o papel essencial do loop β 7- α 7

para governar o modo de ação de XynA. Além disso, esses dados confirmam que XynA é uma exo-oligoxilanase que produz xilose clivando a extremidade redutora.

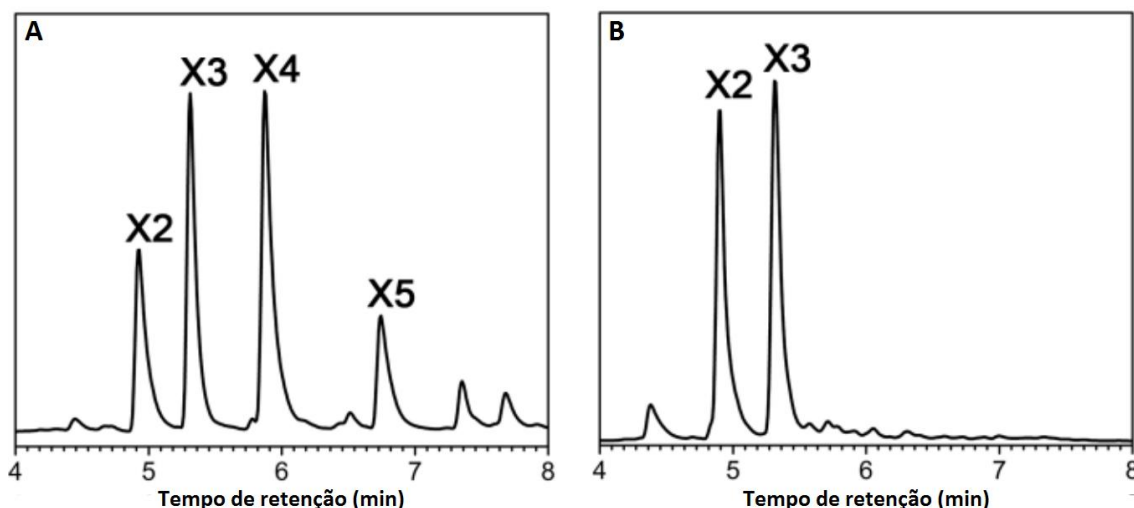


Figura 5.12: Eletroforese capilar de carboidratos (CE-LIF) para os produtos de reações de hidrólise feitas com a XynA mutada quimérica. (A) Produtos de hidrólise de xilano *beechwood*. (B) Produtos de hidrólise de xilohexaose. A reação de hidrólise foi conduzida em tampão fosfato de sódio 40 mM pH 6,5 com a enzima a 0,02 mg/mL e 8 mM de xilohexaose ou xilano *beechwood* 0,5%. Após a reação a marcação dos produtos com APTS seguiu conforme descrito previamente na metodologia (Item 4.3).

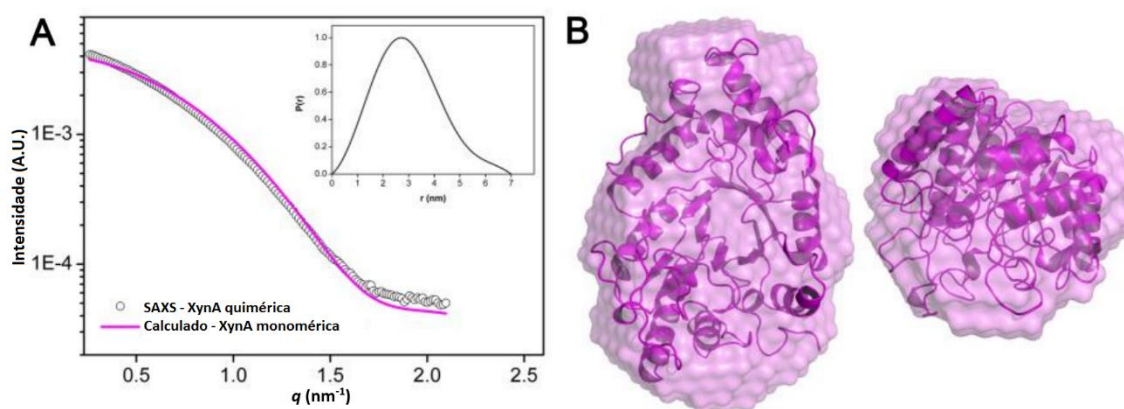


Figura 5.13: Análise de SAXS da XynA mutada quimérica. (A) Curva de espalhamento experimental e curva calculada teórica para a proteína mutada. (B) O modelo monomérico para a proteína mutada ajustado no envelope de SAXS.

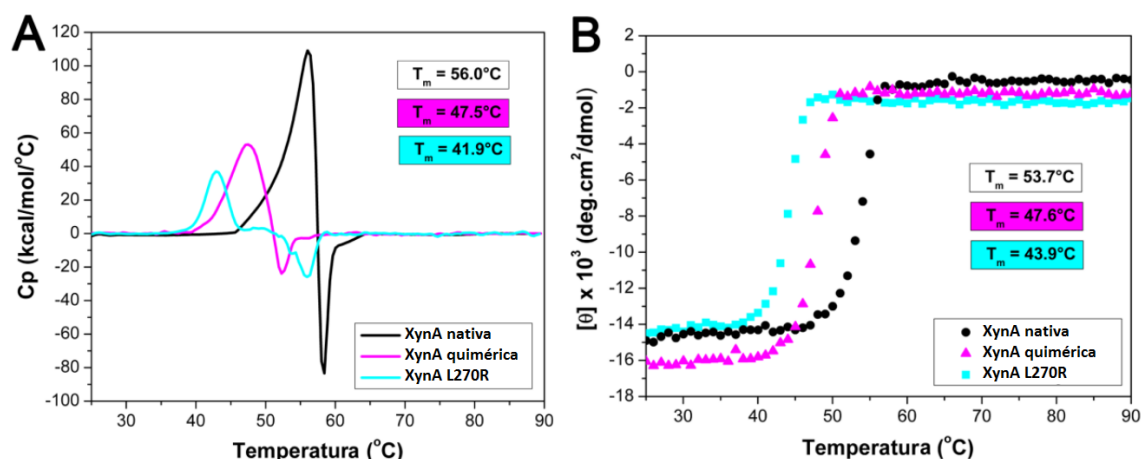


Figura 5.14: Estabilidade térmica das construções de XynA. Os perfis de desnaturação térmica para a XynA nativa, a XynA quimérica e XynA-L270R foram construídos em experimentos utilizando calorimetria de varredura diferencial (A) e dicroísmo circular (B). A temperatura de *melting* de cada um dos experimentos é apresentada nos insertos.

5.3 A XynB é uma endo-1,4- β -xilanase clássica

A XynB apresenta baixa identidade de sequência com endo-1,4- β -xilanases caracterizadas na literatura: 30% com SoXyn10A de *Streptomyces olivaceoviridis* (PDBID: 1ISV) (FUJIMOTO *et al.*, 2002); 28% com TpXyl10B de *Thermotoga petrophila* (PDBID: 3NIY) (SANTOS *et al.*, 2010); 26% com CmXyn10B de *Cellvibrio mixtus* (PDBID: 1UQY) (PELL *et al.*, 2004) e 23% com IXT6 de *Bacillus stearothermophilus* (PDBID: 2Q8X) (SOLOMON *et al.*, 2007). Entretanto, estudos funcionais com mutantes em que o gene da XynB foi deletado em linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* (DÉJEAN *et al.*, 2013), *X. oryzae* pv. *oryzae* (RAJESHWARI; JHA; SONTI, 2005) e *X. campestris* pv. *vesicatoria* (SZCZESNY *et al.*, 2010) mostram que essa enzima exerce papel protagonista para que bactérias do gênero *Xanthomonas* possuam atividade xilanolítica extracelular. Desse modo, as propriedades bioquímicas e estruturais da XynB foram investigadas para elucidar as bases de sua atividade diante dessa baixa identidade de sequência.

A caracterização bioquímico-funcional revelou que XynB é uma endo-xilanase genuína. Essa enzima é ativa tanto em xilano quanto em xilo-oligossacarídeos e possui padrão canônico de clivagem (Figura 5.15). XynB apresentou atividade entre pHs 4,5-8,0 e temperatura ótima de 35°C, da mesma forma que a XynA quimérica (Figura 5.16). Uma ampla variedade de substratos celulósicos e hemicelulósicos, com diferentes tipos de composições

e substituições na cadeia principal, foram testados. Assim como outras xilanases clássicas, XynB apresentou atividade apenas em polissacarídeos constituídos por xilose. A maior atividade de XynB é na hidrólise de cadeias lineares de xilano (xilano *beechwood*), mas também catalisa a hidrólise de xilanos substituídos na cadeia principal (arabinoxilanos *wheat* e *rye*) (Tabela 5.2).

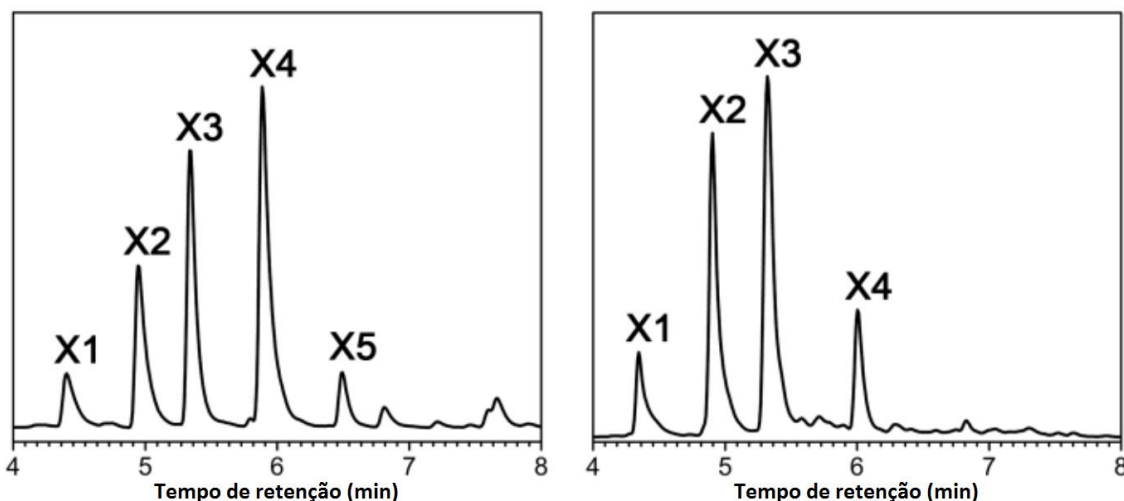


Figura 5.15: Eletroforese capilar de carboidratos (CE-LIF) para os produtos de reações de hidrólise feitas com a XynB nativa. (A) Produtos de hidrólise de xilano *beechwood*. (B) Produtos de hidrólise de xilohexaose.

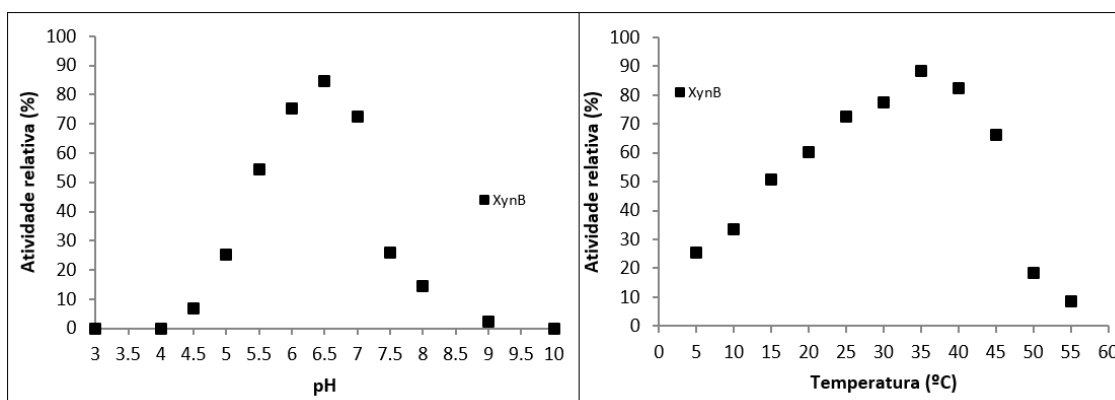


Figura 5.16: A influência do pH e da temperatura na atividade de XynB. A atividade em diferentes pHs foi testada em tampão citrato-fosfato 40 mM adicionado de glicina 40 mM (faixa entre 2,0 e 10,0) a 35°C em xilano *beechwood* 0,5%. O efeito da temperatura na atividade enzimática foi testado em tampão fosfato de sódio 40 mM pH 6,5 também em xilano *beechwood* 0,5%. Foi utilizada concentração de enzima igual a 0,0025 mg/mL e 15 min de reação.

Tabela 5.2: Atividade de XynB em diferentes polissacarídeos com xilose na cadeia principal. O xilano *beechwood* é essencialmente um polímero linear de xilose (HESPELL; COTTA, 1995). Os resíduos xilosil dos arabinoxilanos podem ser não-substituídos, mono-substituídos com resíduo de arabinose via o O3 ou di-substituídos via O3 e O2. O arabinoxilano *rye* possui 9% dos resíduos de xilose di-substituídos e 35% mono-substituídos, enquanto o arabinoxilano *wheat* possui mais resíduos di-substituídos (20%) e menos mono-substituídos (14%) (DERVILLY-PINEL; THIBAUT; SAULNIER, 2001).

Substrato	Atividade relativa (%)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
Xilano <i>beechwood</i>	100	401 (±15)
Arabinoxilano <i>rye</i>	86	343 (±23)
Arabinoxilano <i>wheat</i>	38	149 (±24)

5.4 Cálcio afeta a atividade e estabilidade de XynB

Medidas da atividade catalítica de XynB mostraram drástica redução na presença de agentes quelantes, ou seja, XynB é dependente de íons divalentes. A tendência da preferência pelo Ca^{2+} dentre os íons divalentes foi mostrada em testes de atividade (Figura 5.17 e Tabela 5.3). Essa hipótese foi confirmada por testes de cristalografia e calorimetria, que mostraram que XynB se liga a íons Ca^{2+} (Figuras 5.22 e 5.23). Então, foi realizado o estudo do desempenho cinético de XynB assim como purificada e com a complementação de íons CaCl_2 na reação de hidrólise (Tabela 5.4 e Figura 5.18). A adição do íon Ca^{2+} é para garantir que todos os sítios de ligação a esse íon estão ocupados na enzima. Nessa condição XynB apresentou K_M aparente de 2,4 mg/mL e V_{MAX} de 1300 U/mg, o que representa uma eficiência catalítica de 339 mL/mg.s, destacando a importância do Ca^{2+} para a atividade dessa enzima. Observando a Figura 5.15, verificamos que a identificação do padrão de clivagem de xilano e xilohexaose por XynB revela como produtos X2, X3 e X4 como produtos principais, típico de endo-xilanases. Entretanto, nessas reações é possível identificar uma pequena quantidade de xilose, indicando que XynB não é estritamente uma endo-enzima. Embora não seja um resultado esperado, esse mesmo padrão é identificado em outras xilanases GH10 caracterizadas na literatura (SHI *et al.*, 2013; SPURWAY *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2011). As características bioquímicas de XynB confirmam que essa enzima é a principal enzima xilanolítica do sistema CUT de *X. citri* subsp. *citri*, assim como foi observado em estudos *in vivo* realizados para *X.*

oryzae pv. *oryzae* (RAJESHWARI; JHA; SONTI, 2005), *X. campestris* pv. *campestris* (DÉJEAN *et al.*, 2013) e *X. campestris* pv. *vesicatoria* (SZCZESNY *et al.*, 2010).

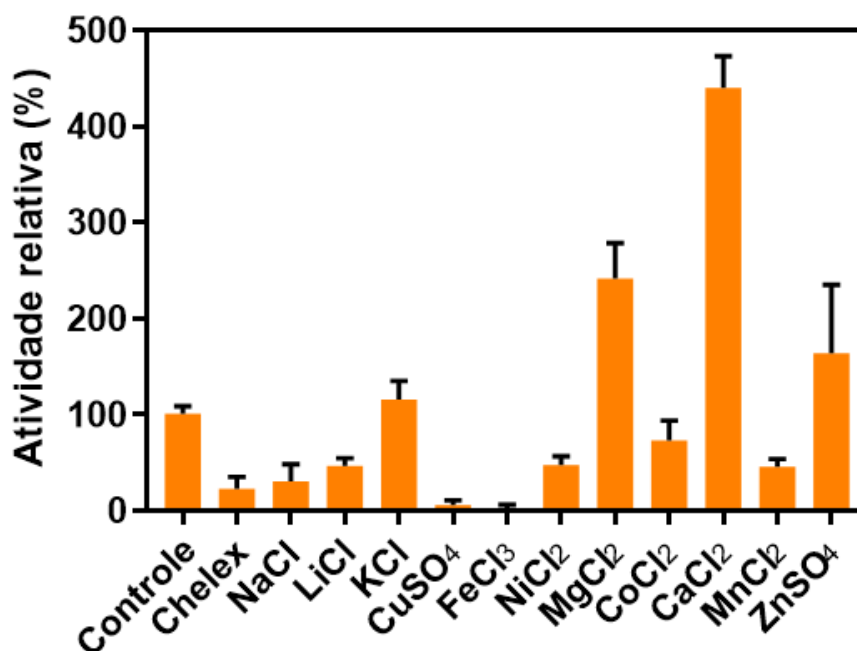


Figura 5.17: Teste de atividade de XynB em presença de íons. A enzima foi tratada com a resina Chelex® 100, quelante de íons divalentes. A performance da enzima após o tratamento com a resina é considerada o controle (100% de atividade) para o cálculo das atividades nesse gráfico.

Tabela 5.3: Atividade de XynB na presença de EDTA e Ca²⁺. A atividade é reduzida drasticamente na presença de EDTA e recuperada com a adição do íon cálcio.

Condição de reação	Atividade relativa (%)
XynB + Ca ²⁺ 10 mM	100
XynB + EDTA 1 mM	15,72
XynB + EDTA 10 mM	12,01
XynB+ EDTA 1 mM+ Ca ²⁺ 10 mM	100,31

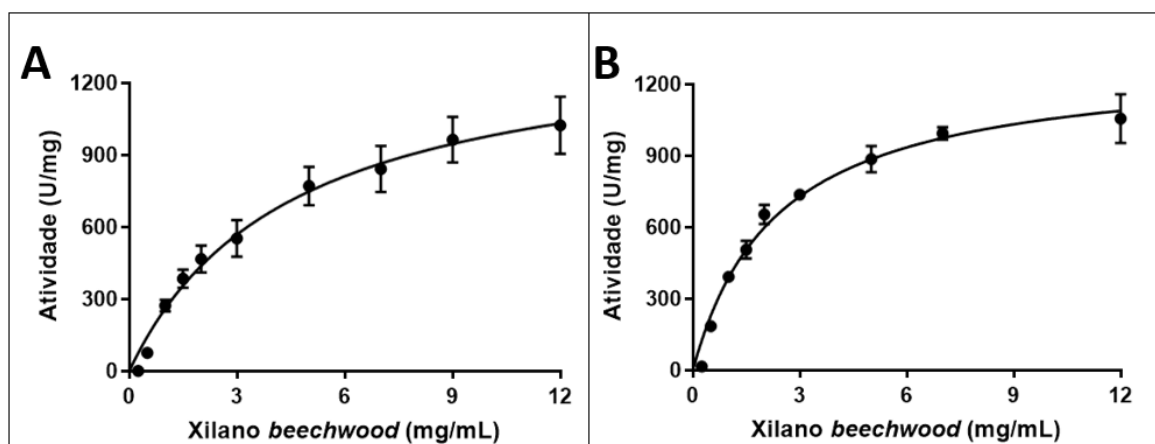


Figura 5.18: Perfis cinéticos da enzima XynB em tampão MES pH 6,5 100 mM (A) e no mesmo tampão adicionado de Ca²⁺ 10 mM (B). Os ensaios de atividade foram realizados a 35°C com a enzima na concentração de 0,0025 mg/mL em 15 min de reação. Todos os experimentos foram feitos com seis repetições em microplacas. R² XynB= 0,9569; R² XynB+Ca²⁺= 0,9684.

Tabela 5.4: Parâmetros cinéticos calculados para XynB e para XynB adicionada de 10 mM de CaCl₂ em tampão MES 0,1 M pH 6,5. As reações foram mantidas a 35°C. Fosfato de sódio, MES, PIPES, Tris-HCl, e succinato de sódio foram testados como agentes tamponantes. Foi escolhido o tampão MES, em que a enzima apresenta maior atividade, além de ser um composto que não é quelante de íons divalentes.

<i>Parâmetro</i>	<i>XynB (como purificada)</i>	<i>XynB Ca²⁺</i>
K_M (mg mL ⁻¹)	4,5 (±0,5)	2,4 (±0,2)
V_{MAX} (U mg ⁻¹)	1400 (±0,2)	1300 (±0,1)
K_{cat} (s ⁻¹)	870 (±111)	801 (±69)
K_{cat}/K_M (s ⁻¹ mg ⁻¹ mL)	195 (±34)	339 (±40)

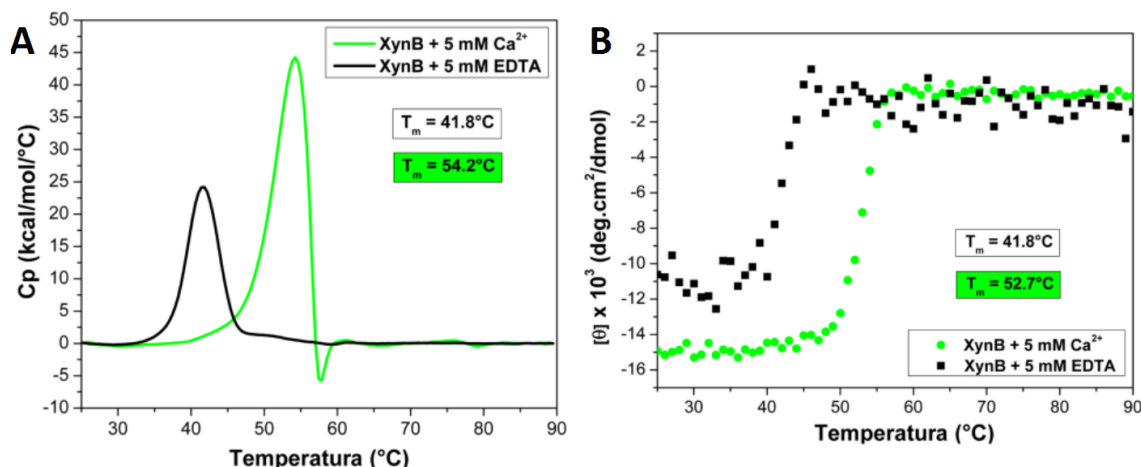


Figura 5.19: O papel do íon Ca^{2+} na estabilidade estrutural de XynB. Estabilidade térmica de XynB na presença de Ca^{2+} ou EDTA avaliada utilizando calorimetria de varredura diferencial (A) e dicroísmo circular (B). A temperatura de *melting* de cada um dos experimentos é apresentada nos insertos.

5.5 Análise estrutural de XynB revela subsítios positivos divergentes

Os estudos cristalográficos de XynB revelaram que essa enzima possui um enovelamento canônico $(\beta/\alpha)_8$. As maiores diferenças estruturais em relação a outras xilanases GH10 se encontram nos resíduos de aminoácidos que formam a interface catalítica, especialmente na região dos sub-sítios positivos (Figura 5.20). A análise do mapa de densidade eletrônica indicou a presença de um íon nas proximidades do sítio ativo, e baseado nas distâncias de ligação, geometria de coordenação e o fator-B (ZHENG *et al.*, 2014), indicam provavelmente ser o Ca^{2+} (discutido detalhadamente na sessão posterior). Os dados funcionais e os estudos calorimétricos corroboram essa hipótese.

Estruturas da proteína complexada com xilose e xilo-oligossacarídeos (X2 e X3) também foram resolvidas em alta resolução (Figura 5.21), mostrando sub-sítios -3, -2 e -1 conservados (Figura 5.7), como já reportado em outros estudos cristalográficos de xilanases GH10 (FUJIMOTO *et al.*, 2002; NAJMUDIN *et al.*, 2010; PELL *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2010). O resíduo de xilose que ocupa o sub-sítio -3 não realiza interações produtivas com nenhum resíduo de aminoácido da proteína, com sua orientação determinada apenas pelas imposições estéricas das ligações glicosídicas do trissacarídeo. Igual modo de ligação a X3 foi observado para CmXyn10B e SoXyn10A, indicando que o sub-sítio -3 não parece ser produtivo para reconhecimento e ligação ao substrato. Curiosamente, os sub-sítios -2 e -1 são conservados também em XynA,

que possui atividade diferente de XynB, o que revela um alto grau de conservação nos sub-sítios envolvidos no reconhecimento do carboidrato. Com base nessa observação, pode-se concluir que os sub-sítios negativos não são a base para diversidade funcional dentro da família GH10.

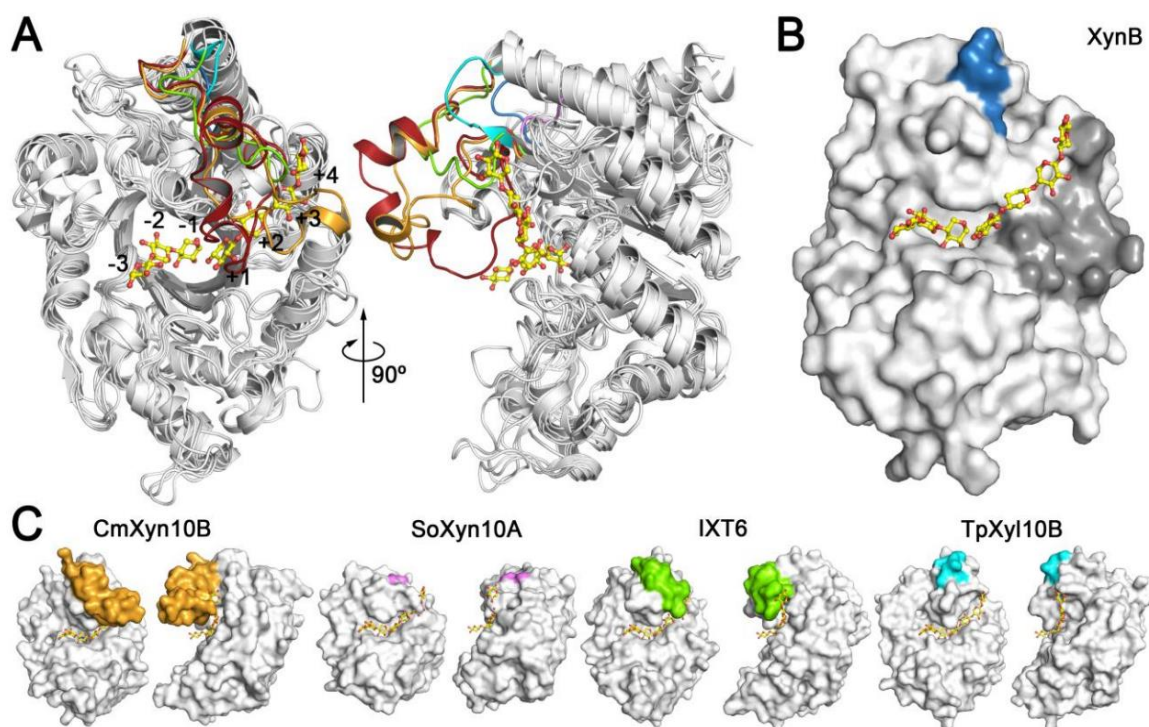


Figura 5.20: Comparação estrutural de XynB com outras xilanases GH10 cujas caracterizações estão disponíveis na literatura. **(A)** Superposição de XynA (PDBID: 4PMV), CmXyn10B (PDBID: 1UQY) (PELL *et al.*, 2004), SoXyn10A (PDBID: 1ISV) (FUJIMOTO *et al.*, 2002), IXT6 (PDBID: 2Q8X) (SOLOMON *et al.*, 2007) e TpXyl10B (PDBID: 3NIY) (SANTOS *et al.*, 2010) em XynB (PDBID: 4PMX). **(B e C)** Superfícies moleculares das xilanases enumeradas em (A), exceto XynA. O *loop* $\beta 7$ - $\alpha 7$ está destacado nas figuras com o mesmo padrão de cores. O cinza mais escuro na superfície de XynB em (B) indica a região divergente dos sub-sítios positivos que em outras xilanases é ocupada pelo *loop* Val136-Trp166.

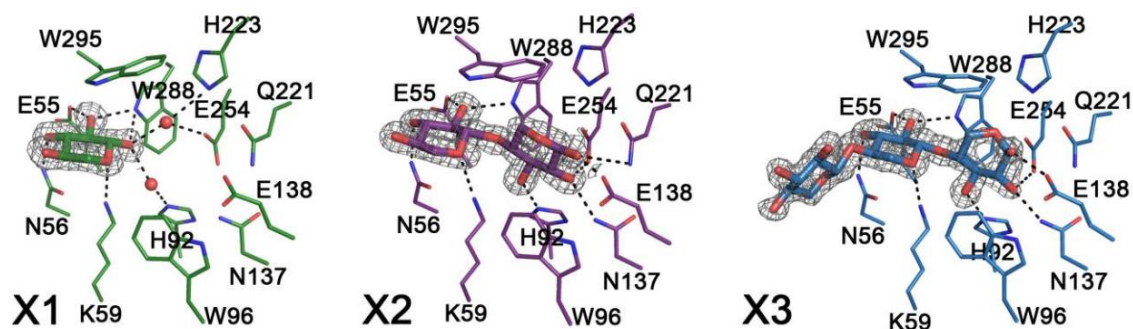


Figura 5.21: Complexos de XynB com xilo-oligosacarídeos. Os resíduos que compõem os sub-sítios negativos de XynB são mostrados e as interações polares com os carboidratos foram marcadas. Os mapas de densidade eletrônica dos ligantes são mostrados para ilustrar a qualidade dos dados.

Em contraste com a região que forma os sub-sítios negativos, os sub-sítios positivos divergem amplamente em termos de geometria e propriedades físico-químicas. Mesmo o sub-sítio +1, que deveria ser conservado como requerimento mínimo para reconhecimento e clivagem das ligações β -1,4 entre os resíduos de xilose, contém diferenças significativas na rede de interação que suporta a ligação ao substrato. Dois resíduos aromáticos são totalmente conservados (Tyr190 e Trp295), entretanto, XynB tem um resíduo carregado positivamente (Arg296) que também forma um o sub-sítio +1, enquanto na CmXyn10B esse resíduo é substituído por um resíduo hidrofóbico (Phe340). Em SoXyn10A, o sub-sítio +2 é baseado exclusivamente em interações polares envolvendo Asn209, Ser212 e Arg275, enquanto em XynB, um resíduo aromático (Phe225) substitui os dois resíduos polares Asn209 e Ser212. Já em CmXyn10B, o sub-sítio +2 é compreendido basicamente um resíduo de triptofano, que é localizado do lado oposto a Phe225. Não é possível mapear resíduos envolvidos nos demais sub-sítios positivos de XynB, devido à grande variação estrutural entre xilanases GH10 já caracterizadas.

Ainda em relação aos sub-sítios positivos, CmXyn10B exibe uma alça β 7- α 7 estendida, a mesma alça que está relacionada ao comportamento funcional diferenciado de XynA, que contribui para a formação dos sub-sítios +2, +3 e +4; e SoXyn10A possui também um sub-sítio +5 formado por um resíduo de triptofano (Trp179). Em XynB, ambos os motivos citados estão ausentes e a região altamente conservada entre xilanases GH10 que compreende os resíduos Val136-Trp166 adota uma conformação muito particular, que produz um amplo sítio ativo (Figura 5.20). Essa característica pode explicar a habilidade que XynB

possui de clivar cadeias decoradas de xilano. Essas observações em conjunto com as diferenças estruturais encontradas em XynA indicam claramente que distinções na arquitetura dos sub-sítios positivos estão intimamente associadas ao comportamento funcional de enzimas GH10 em termos de eficiência catalítica, padrão de clivagem e reconhecimento do substrato.

5.6 Base estrutural da importância do íon cálcio para enzima XynB

Os estudos bioquímicos de XynB mostraram um forte efeito inibitório de agentes quelantes sobre a atividade dessa enzima (Figura 5.17 e Tabela 5.3), o que indica que há contribuição de íons divalentes para o desempenho catalítico. De fato, a atividade de XynB não só foi recuperada pela adição de íons Ca^{2+} após tratamento com EDTA, como também foi cerca de 5 vezes maior. A atividade enzimática de XynB também foi recuperada cerca de 2 vezes após a adição do íon magnésio, enquanto outros íons metálicos não resultaram em recuperação significativa da atividade xilanolítica.

Em relação à importância do Ca^{2+} para a estabilidade da proteína, estudos de dicroísmo circular e calorimetria diferencial de varredura mostraram considerável estabilização na estrutura de XynB por íons cálcio ($\Delta T_m = +11^\circ\text{C}$) (Figura 5.19). Esses resultados corroboram a hipótese de que tanto a estabilidade estrutural de XynB quanto seu desempenho catalítico são afetados por íons Ca^{2+} . Até o estudo de XynB, o efeito estabilizador desse íon havia sido mostrado na literatura relacionada à família GH10 apenas para a enzima CjXylA ($\Delta T_m = +6^\circ\text{C}$) (SPURWAY *et al.*, 1997). Entretanto, no caso de CjXylA o íon Ca^{2+} não influencia na atividade catalítica, sugerindo que esse efeito duplo é único de XynB. Além disso, medidas de calorimetria indicam que a constante de afinidade (K_a) para esse íon é igual a $4,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e há um sítio de ligação por monômero (Figura 5.22). Esse K_a é similar ao observado previamente para CjXylA ($K_a = 4,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), embora os sítios de ligação sejam totalmente diferentes.

Os estudos de cristalografia mostraram que na estrutura de XynB o cálcio se liga a um motivo N-terminal entre o *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$ e a hélice $\alpha 3$ que é localizado do lado oposto à interface catalítica em comparação com o sítio de ligação ao cálcio de CjXylA (Figura 5.23). Esse íon é preso em um octaedro O_6 formado pelas cadeias laterais dos resíduos Glu64, Asp68,

Glu115 e Gln118 e por duas moléculas de solvente. Esses resíduos não são conservados em outros membros da família GH10, indicando que XynB possui um sítio único de ligação ao cálcio que também está presente apenas em órtologos do gênero *Xanthomonas*. Embora o sítio de ligação ao cálcio não esteja envolvido diretamente na formação do sítio ativo, sua posição estratégica desempenha um papel importante na estabilização das alças que compreendem os sub-sítios -1 e -2. Essa observação foi analisada e corroborada por simulações de dinâmica molecular. Desse modo, a presença do íon cálcio é relevante estruturalmente para a manutenção da geometria do sítio ativo e perturbações nessa região podem afetar tanto o reconhecimento quanto a ligação ao substrato.

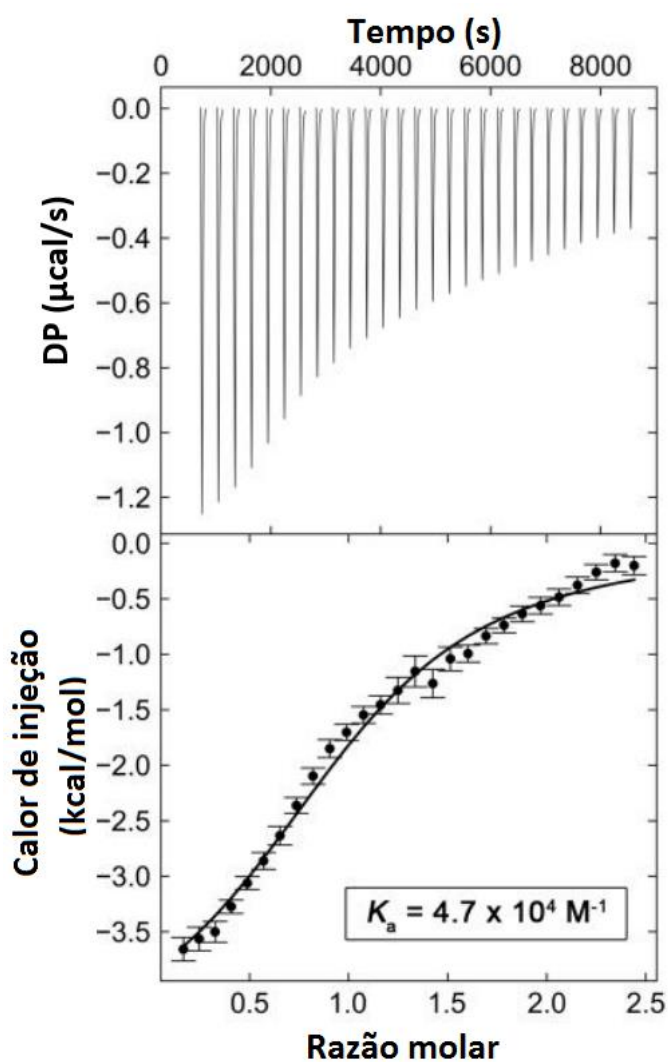


Figura 5.22: Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para determinação da constante de afinidade da ligação ao íon cálcio (K_a).

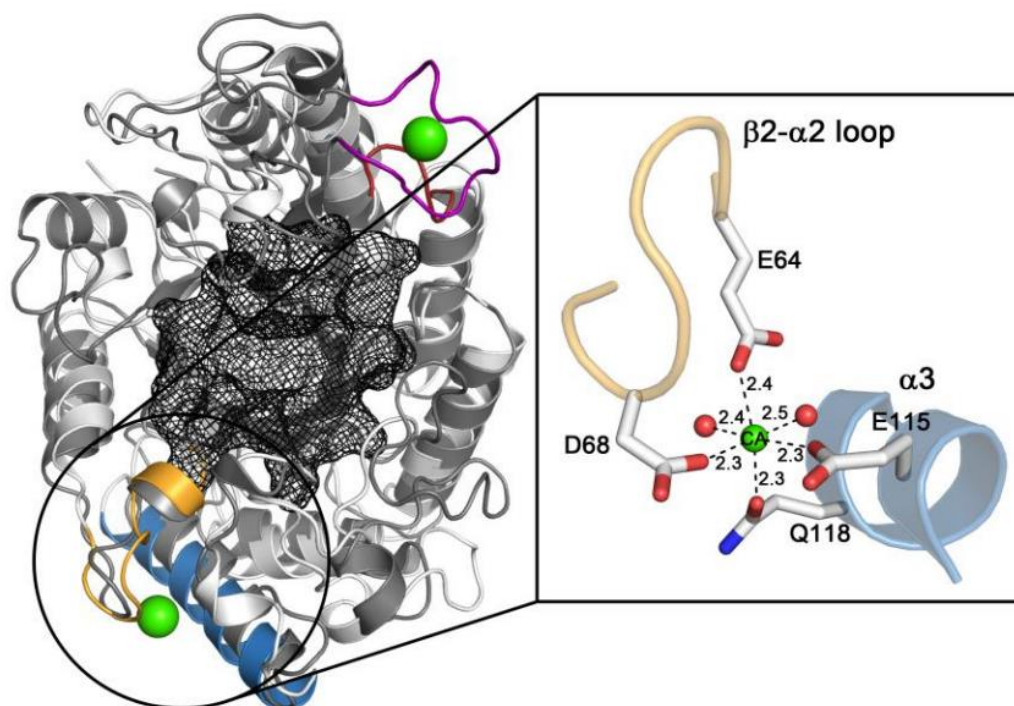


Figura 5.23: O sítio de ligação ao íon cálcio de XynB. Superposição da estrutura de CjXylA (cinza, PDBID: 1CLX) na estrutura de XynB (branco). As regiões que formam o sítio de ligação ao cálcio de CjXylA estão coloridas em vermelho e rosa. As regiões que formam o sítio de ligação ao cálcio de XynB estão coloridas em azul e laranja. A fenda catalítica de XynB está delineada como uma malha preta. A coordenação do íon cálcio em XynB está mostrada em detalhes na caixa.

5.7 XynA quimérica e XynB hidrolisam licor rico em xilo-oligossacarídeos extraído de cana-de-açúcar

O licor concentrado em xilo-oligômeros que é oriundo do pré-tratamento hidrotérmico auto-catalisado do bagaço de cana foi utilizado para testar a capacidade de hidrólise de XynA quimérica e XynB quando adicionadas em um substrato industrial de real aplicação e interesse biotecnológico. A Tabela 5.5 apresenta a caracterização do licor de xilo-oligossacarídeos concentrado, que foi utilizado nesse experimento, e a sua composição monomérica após hidrólise ácida. A diferença entre as concentrações de monossacarídeos e outros componentes após e antes da hidrólise ácida é usada para se estimar a concentração de polissacarídeos.

Tabela 5.5: Caracterização do licor de pré-tratamento hidrotérmico concentrado sem e com hidrólise ácida.

Componentes	Licor de Xilo-oligossacarídeos	Licor de Xilo-oligossacarídeos completamente hidrolisado com ácido
Glicose (g/L)	0,83	7,78
Xilose (g/L)	11,17	54,84
Arabinose (g/L)	0,86	3,59
Galactose (g/L)	n.a*	n.a*
Ácido Fórmico (g/L)	0,65	n.a*
Ácido Acético (g/L)	1,24	n.a*
Furfural (g/L)	0,24	n.a*
HMF (g/L)	0,03	n.a*

*n.a = Não determinado

Tabela 5.6: Resultados dos ensaios de hidrólise do licor de xilo-oligossacarídeos extraídos de cana-de-açúcar previstos no DCCR 2².

Ensaio	Xilo-oligossacarídeos (g/L)	Enzima (mg/mL)	Xilose liberada XynA quimérica (g/L)	% de hidrólise dos xilo-oligossacarídeos XynA quimérica	Xilose liberada XynB (g/L)	% de hidrólise dos xilo-oligossacarídeos XynB
1	4,5 (-1)	0,3 (-1)	1,29	28,6	1,38	30,6
2	25,8 (1)	0,3 (-1)	6,78	26,3	7,29	28,2
3	4,5 (-1)	1,7 (1)	1,25	27,8	1,58	35,1
4	25,8 (1)	1,7 (1)	7,78	30,1	7,94	30,7
5	1 (-1,41)	1 (0)	0,34	34	0,35	35
6	30 (1,41)	1 (0)	8,50	28,3	8,17	27,2
7	15,5 (0)	0 (-1,41)	0,0	0,0	0,0	0,0
8	15,5 (0)	2 (1,41)	4,13	26,6	5,10	32,9
9	15,5 (0)	1 (0)	4,13	26,6	4,68	30,2
10	15,5 (0)	1 (0)	4,21	27,1	4,89	31,6
11	15,5 (0)	1 (0)	4,17	26,9	4,69	30,3

Os resultados das hidrólises do substrato rico em xilo-oligossacarídeos utilizando a XynA quimérica e a XynB nativa de *X. citri* subsp. *citri* são apresentados na Tabela 5.6. Os dados mostram que ambas as enzimas testadas foram capazes de hidrolisar os xilo-oligômeros de cana-de-açúcar e a porcentagem de conversão variou de forma pouco abrangente entre os ensaios (26,6% a 35,1%). Nesse experimento, a concentração das enzimas estudadas foi amplamente variada (0,3 a 2 mg/mL), portanto, esperava-se *a priori* que as porcentagens de conversão na hidrólise variassem de forma mais proeminente. Rendimentos de hidrólise em torno de 30% foram alcançados em todos os pontos testados e o próprio efeito da adição de enzima ao licor é pequeno se comparado com o efeito da concentração de licor (Tabelas 5.7 a 5.9). Isso indica uma limitação na hidrólise intrínseca ao substrato, que é provavelmente explicada pela substituição da cadeia principal de xilose por resíduos de arabinose. Vale a pena ressaltar que estudos de caso na literatura em que a celulose é sacarificada com os melhores coquetéis enzimáticos disponíveis no mercado, mostram rendimentos de hidrólise variando aproximadamente de 50 a 70% (BANERJEE *et al.*, 2012; MARTINS; RABELO; COSTA, 2015). Para o caso específico das hemiceluloses, Hu e colaboradores (2016) trabalharam com o licor de xilo-oligossacarídeos advindo do pré-tratamento hidrotérmico de palha de trigo. Esses autores otimizaram vários parâmetros de hidrólise, dentre eles a composição do coquetel enzimático, misturando preparações como Cellic CTec2, Cellic CTec3 e Cellic HTec, o teor de sólidos e o pH de hidrólise. Os rendimentos desse trabalho nas condições otimizadas atingiram 90% (HU, JINGUANG *et al.*, 2016). As Tabelas 5.7 e 5.8 mostram as análises de variâncias os modelos obtidos (Tabela 5.9). Em ambos os casos o $F_{\text{calculado}}$ foi cerca de nove vezes maior que o F_{tabelado} , com coeficientes de correlação de aproximadamente 86%.

Tabela 5.7: Análise de variância do modelo para a produção de xilose aplicando XynA quimérica em licor (g/L).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F*
Regressão	75,04	2	37,52	26,6
Resíduo	11,34	8	1,41	
Total	86,38	10		

Coeficiente de correlação = 86,8%

* $F_{0,1; 2,8} = 3,11$

Tabela 5.8: Análise de variância do modelo para a produção de xilose aplicando XynB em licor (g/L).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F*
Regressão	76,14	2	38,07	25,1
Resíduo	12,16	8	1,52	
Total	88,30	10		

Coeficiente de correlação = 86,2%

*F_{0,1; 2;8} = 3,11

Os modelos ajustados apenas com os coeficientes significativos (p -valor < 0,1) para a construção do modelo de regressão são apresentados na tabela 5.9. Todos os coeficientes quadráticos e a interação não foram significativos. Desse modo nota-se que os modelos geram duas superfícies lineares (Figura 5.24).

Tabela 5.9: Regressões construídas com base nos dados experimentais da tabela 5.6 que indicam a concentração de xilose liberada em função das concentrações de licor e de enzima adicionadas na reação de hidrólise.

Regressões reparametrizadas	
XynA quimérica	$Y_{\text{Xilose (g/L)}} = 3,86 + 2,94 [\text{Xilo-oligossacarídeos}] + 0,84 [\text{XynA quimérica}]$
XynB	$Y_{\text{Xilose (g/L)}} = 4,18 + 2,92 [\text{Xilo-oligossacarídeos}] + 1,0 [\text{XynB}]$

Pode-se depreender a partir da observação dos modelos obtidos que em ambos os casos a concentração de enzima não impactou de forma notável. Esse fato pode ser interpretado como eficiente performance da atividade das enzimas testadas, uma vez que mesmo concentrações muito baixas de ambas enzimas foram capazes de atingir o máximo de rendimento de liberação de xilose monomérica. Embora o efeito individual de XynB seja ligeiramente maior que o da XynA quimérica, ambas performances foram muito similares. Desse modo as enzimas testadas foram eficazes para produzir xilose a partir de um substrato de real interesse biotecnológico. A Figura 5.24 apresenta as superfícies geradas a partir dos modelos da Tabela 5.9. Como os coeficientes quadráticos não foram significativos, as superfícies geradas são planas. Ou seja, tanto a concentração de xilo-oligossacarídeos como a concentração das enzimas impactam de forma linear na concentração de xilose liberada.

Desse modo, os maiores valores de xilose liberada (variável resposta) são obtidos em altas concentrações de enzima e altas concentrações de licor. Entretanto, conforme discutido anteriormente, o impacto da adição de enzima foi limitado por características intrínsecas ao substrato. Isso também pode ser observado nas superfícies geradas, pois nota-se que há regiões de baixa concentração de enzima que geram altas concentrações de xilose livre.

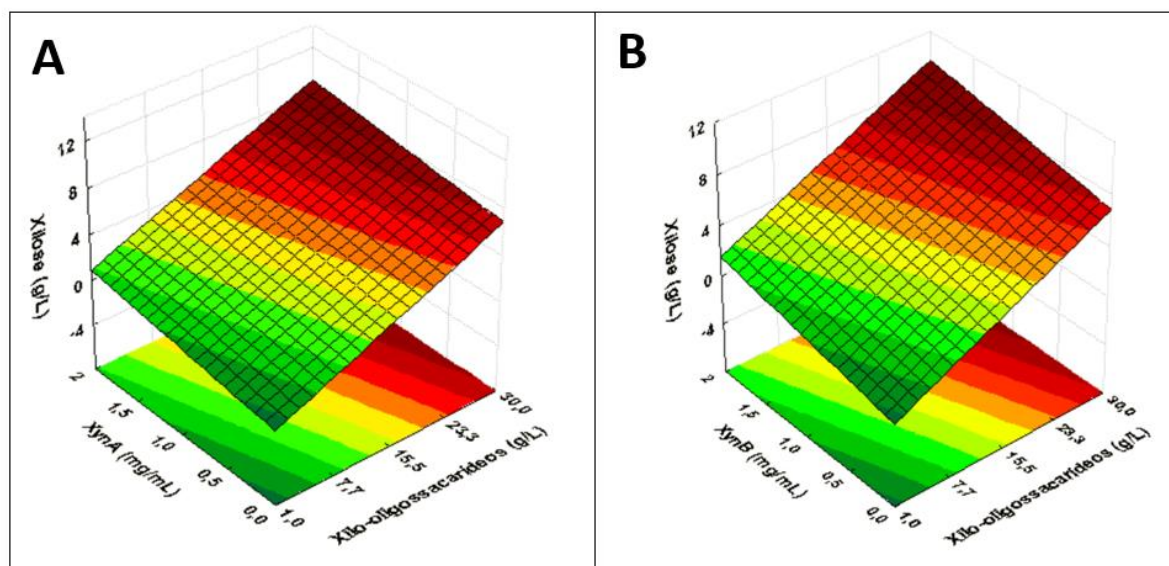


Figura 5.24: Superfícies de resposta que mostram a produção de xilose monomérica em função da concentração de xilo-oligosacarídeos e de enzima adicionados na reação de hidrólise. (A) Superfície construída com o modelo utilizando a XynA (mg/mL). (B) Superfície construída com o modelo utilizando a XynB (mg/mL).

6 – DISCUSSÃO

6.1 Evolução e função na família GH10

É uma característica notável da família GH10 que a região dos sub-sítios negativos foi preservada quase intacta ao longo da evolução das proteínas que constituem esse grupo, enquanto os sub-sítios de reconhecimento à extremidade redutora dos substratos sofreram profundas modificações que permitiram modelar a função dessas enzimas em procariotos e eucariotos. A inspeção das estruturas de proteínas GH10 depositadas no *Protein Data Bank* confirma que os sub-sítios -2 e -1 são conservados independentemente da similaridade de sequência e do modo de ação, como reportado para as enzimas de *X. citri* subsp. *citri* e homólogos. Em contraste, a região dos sub-sítios positivos é muito divergente mesmo entre xilanases GH10 com similaridade de sequência maiores que 45%. Curiosamente, o segmento mais divergente dessa região é o *loop* que conecta os elementos $\beta 7$ - $\alpha 7$. XynA contém uma inserção nesse motivo que induz a dimerização da proteína e bloqueia o sub-sítio +2, enquanto em CmXyn10B há uma longa alça que participa na formação dos sub-sítios +2, +3 e +4. Em outras GH10, incluindo XynB, TpXyl10B e SoXyn10A, essa alça é encurtada e outras alças, como $\beta 6$ - $\alpha 6$ e $\beta 8$ - $\alpha 8$, participam na formação dos sub-sítios positivos. Em TpXyl10B, foi demonstrado que mudanças conformacionais na alça $\beta 8$ - $\alpha 8$, induzidas pelo aumento da temperatura, modifica o padrão de clivagem da enzima (SANTOS *et al.*, 2014). Da mesma forma que as estruturas moleculares dos sub-sítios positivos são distintas entre as enzimas GH10, as bases físico-químicas para ligação ao substrato são variáveis. SoXyn10A interage com o resíduo de xilose no sub-sítio +2 através de contatos polares, enquanto em CmXyn10B essas interações são hidrofóbicas. As regiões envolvidas com a formação dos sub-sítios positivos são tão divergentes que não é possível mapear sub-sítios positivos após +2 em XynB por homologia estrutural.

Em resumo, dados estruturais e funcionais disponíveis para enzimas da família GH10, incluindo as contribuições desse trabalho com as enzimas de *X. citri* subsp. *citri*, mostram que os sub-sítios negativos possuem um mecanismo comum de reconhecimento molecular. Além disso, há grande variabilidade nos sub-sítios positivos mesmo entre enzimas altamente similares. Desse modo, mudanças nessa região dirigem de forma imprevisível o comportamento funcional, a eficiência catalítica e o modo de ação das enzimas GH10.

6.2 Implicações biológicas: Como as enzimas GH10 contribuem para a patogênese e para o crescimento

As plantas possuem inúmeros mecanismos de defesa que evoluíram para prevenir a infecção por micro-organismos patogênicos (BROEKAERT *et al.*, 1995; GRENNAN, 2006; LIU *et al.*, 2005; VERONESE *et al.*, 2003). Muitos fungos fitopatogênicos produzem um repertório de CWDEs, como celulasas e xilanases, que auxiliam a colonização e a captação de nutrientes (FAURE, 2002; KING *et al.*, 2011; VAN VU *et al.*, 2012). Entretanto, os oligossacarídeos que são gerados por essas enzimas são monitorados pela planta e induzem a resposta imune inata (SHIBUYA; MINAMI, 2001). As plantas podem ainda produzir inibidores de proteínas, como glucanases, que afetam diretamente a patogênese (FIERENS *et al.*, 2005; YOSHIKAWA *et al.*, 2012). *Xanthomonas* spp. possuem um arsenal completo de CWDEs, mas o papel provável dessas enzimas na patogênese e nas interações planta-patógeno ainda era desconhecido. Neste trabalho, a estrutura e a função das duas principais enzimas GH10 de *X. citri* subsp. *citri* relacionadas como xilanases foram elucidadas, e esses dados servem como modelo para entender os eventos moleculares associados tanto à degradação de xilano quanto à patogênese.

A enzima divergente XynB mostrou-se a principal enzima do sistema xilanolítico de *X. citri* subsp. *citri*, desempenhando papel fundamental na degradação da hemicelulose (Figura 6.1). A hidrólise desses polissacarídeos está provavelmente relacionada com a captação de nutrientes. Além disso, o dano à integridade da parede celular pode representar uma vantagem para o patógeno, uma vez que essa atividade facilita montagem de T3SS, e consequentemente, a translocação de proteínas efetoras. De fato, muitos genes T2SS de *Xanthomonas* spp., em sua maioria CWDEs, são co-regulados com elementos de T3SS, corroborando com esse modelo (JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2007; SZCZESNY *et al.*, 2010; YAMAZAKI; HIRATA; TSUYUMU, 2008). Entretanto, o dano à parede celular pode ser considerado uma vantagem e ao mesmo tempo um problema, uma vez que além de servir para a entrada do fitopatógeno e a translocação de proteínas efetoras, pode funcionar também como sinalização para acionar a resposta imune do hospedeiro (RYAN, 1987).

Alguns patógenos de plantas desenvolveram ao longo da evolução estratégias moleculares para suprimir a ativação da resposta imune causada por oligossacarídeos que são

produzidos pelas CWDEs (DE JONGE *et al.*, 2010; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005). O fato de XynA degradar xilo-oligossacarídeos produzidos por XynB sugere que essa nova enzima GH10 pode fazer parte de uma estratégia de *Xanthomonas* para suprimir as respostas de defesas induzidas por oligossacarídeos. Um mecanismo similar de supressão já foi observado para outros fitopatógenos; entretanto, envolvendo proteínas quitinase-like (DE JONGE *et al.*, 2010). Além disso, pode-se especular que a dimerização de XynA e a baixa identidade de sequência de XynB com outras xilanases GH10 de fitopatógenos – principalmente fungos que são tipicamente degradadores de parede celular – são mecanismos de camuflagem para evitar o reconhecimento por receptores e inibidores da planta. Essas descobertas e interpretações indicam potencialmente um novo mecanismo molecular associado à interação planta-*Xanthomonas* e fornece modelos de como esse patógeno desenvolveu estratégias sofisticadas para superar as barreiras de defesa do hospedeiro.

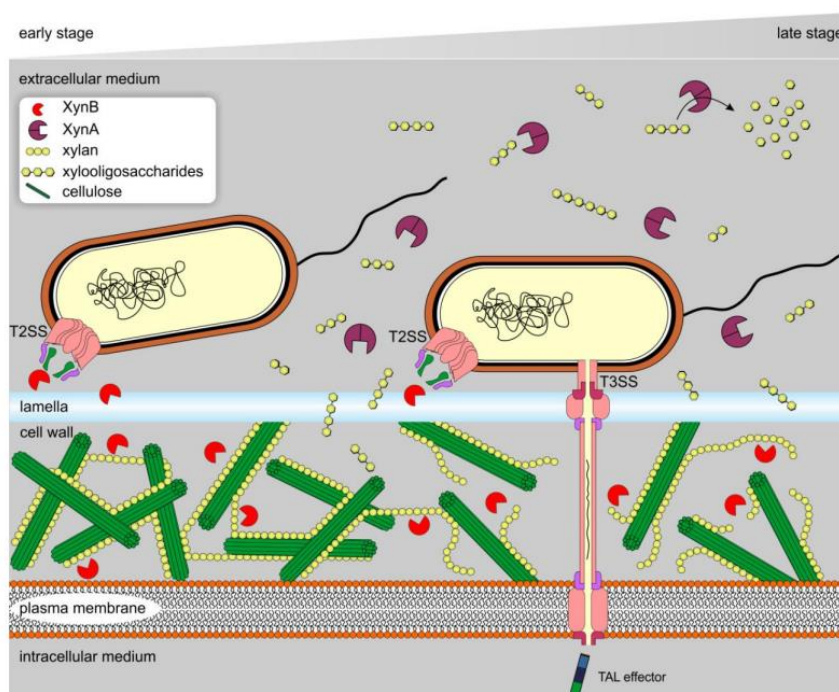


Figura 6.1: Representação esquemática dos papéis exercidos por XynA e por XynB durante a infecção por *Xanthomonas* e a patogênese. Em um estágio inicial, T2SS secreta hidrolases glicosídicas incluindo XynA e XynB. XynB possui um papel primário na degradação da fração hemicelulósica da parede celular que é importante para a captação de nutrientes e para romper a primeira barreira física contra o ataque bacteriano. O enfraquecimento da parede celular facilita a inserção de T3SS, responsável pela entrega de proteínas efetoras e outras moléculas dentro do citoplasma da célula vegetal. Em um estágio mais tardio, os oligossacarídeos solúveis liberados pela ação de XynB funcionam como elicitores do sistema imune inato e então XynA os sequestra, com sua atividade

de exo-oligoxilanase que produz xilose clivando a extremidade redutora de moléculas de oligossacarídeos, e os cliva em unidades de xilose, suprimindo o desenvolvimento de uma resposta sistêmica.

6.3 Implicações biotecnológicas: alternativas para a degradação de xilano

Alguns micro-organismos saprófitas, como o fungo *Trichoderma reesei*, produzem um amplo arsenal de CWDEs para degradar biomassa vegetal e suas enzimas são utilizadas com sucesso em processos biotecnológicos (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). Entretanto, fitopatógenos como *Xanthomonas* spp., que infectam planta através de estômatos e lesões (GOTTWALD; GRAHAM, 1992; GRAHAM *et al.*, 1992), de forma intrigante possuem um grande número de CWDEs. *X. citri* subsp. *citri*, por exemplo, contem pelo menos 160 genes relacionados com a modificação e degradação de carboidratos espalhados em 44 famílias GH. Esse número é comparável com o arsenal de fungos especializados na degradação de parede celular, como *Aspergillus niger* e *Neurospora crassa* (LOMBARD *et al.*, 2014). Embora essas bactérias representem uma fonte rica para a prospecção de novas enzimas com aplicações biotecnológicas, poucas GH de *Xanthomonas* foram investigadas funcionalmente e estruturalmente. Aqui nossos estudos revelaram mecanismos únicos associados com a degradação de xilano, como a atividade diferenciada de XynA e a estimulação de XynB por Ca^{2+} . Além disso, o redesenho de XynA com base na estrutura de outras xilanases GH10, surpreendentemente gerou um mutante com alta atividade catalítica. Testes de hidrólise de um substrato de elevado interesse biotecnológico, o licor de pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar, retornou valores de hidrólise em torno de 30% para ambas as enzimas de *X. citri* subsp. *citri* em baixos níveis de adição de proteína (0,3 mg/mL). Embora nesse experimento fique evidente a limitação da hidrólise, que ainda depende de atividades catalíticas sinérgicas para que a carga de enzima necessária possa ser adequadamente calculada, XynA engenheirada e XynB são promissoras para bioprocessos que ocorrem em faixa de temperatura moderadamente baixa, como aqueles que aplicam a técnica de sacarificação e fermentação simultâneas para a produção de bioetanol (DORAN-PETERSON *et al.*, 2009). A patente da sequência de XynA quimérica foi depositada com esse propósito junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (BR102150223501).

7 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Embora *xynA* e *xynB* sejam dois genes cujos produtos já eram de provada importância para o gênero *Xanthomonas*, ainda eram totalmente desconhecidas as bases moleculares de sua ação em polissacarídeos hemicelulósicos. Nesse trabalho, concluímos que:

- XynA nativa não apresentou atividade xilanolítica em testes de hidrólise de xilano *beechwood*, apesar de essa sequência ser enquadrada como uma endo-1,4- β -xilanase GH10 pelo banco de enzimas ativas em carboidratos (CAZy);
- XynA apresentou estrutura dimérica estável em análises de cristalografia e espalhamento de raios X a baixos ângulos;
- A análise de eletroforese capilar de xilohexaose hidrolisada por XynA nativa, combinada com a quantificação por HPLC do efeito sinérgico da adição de XynA e XynB na hidrólise de xilano *beechwood* sugeriram que essa enzima é uma exo-oligoxilanase que atua no terminal redutor da molécula do polissacarídeo/oligossacarídeo liberando xilose. A atuação no terminal redutor ficou evidente a partir da análise dos dados de cristalografia, que mostram na geometria do sítio ativo de XynA nativa, os sub-sítios positivos a partir do +2 bloqueados por impedimentos estéricos provocados pela dimerização;
- A construção da proteína mutada XynA-L270R provocou o rompimento da estrutura dimérica e recuperou a atividade xilanolítica de XynA;
- A construção de uma proteína mutada quimérica (XynA quimérica), em que a alça que conecta os elementos topológicos β 7- α 7 estabilizando a dimerização em XynA nativa foi substituída por uma sequência canônica de endo-1,4- β -xilanases, provocou o rompimento da estrutura dimérica e resultou em uma proteína sete vezes mais ativa em xilano *beechwood* a 35 °C que aquelas que haviam sido previamente descritas na literatura para essa faixa de temperatura;
- XynB mostrou-se uma endo-1,4- β -xilanase genuína com parâmetros cinéticos adequados e padrão de clivagem típico de endo-1,4- β -xilanases;
- XynB apresentou estrutura monomérica em estudos cristalográficos;
- XynB é dependente do íon cálcio para desempenhar atividade xilanolítica. Além disso, estudos de calorimetria e dicroísmo circular mostraram que

esse íon estabiliza a estrutura de XynB, elevando a temperatura de *melting* em torno de 11 °C.

- Tanto XynA quimérica quanto XynB foram capazes de hidrolisar o licor concentrado em xilo-oligômeros que é oriundo do pré-tratamento hidrotérmico autocatalisado do bagaço de cana-de-açúcar. A porcentagem de conversão dos xilo-oligossacarídeos variou entre 26,6% a 35,1% nos pontos experimentais estabelecidos pelo delineamento central composto rotacional.

As descobertas que foram apresentadas nesse trabalho sugerem novas estratégias moleculares para a desconstrução da parede celular de plantas (conforme discutido no item 6.2), ampliando nosso conhecimento sobre atividades e mecanismos regulatórios da família GH10, e destacando o amplo potencial de bactérias fitopatogênicas como fonte de enzimas biotecnologicamente relevantes. Os resultados que foram apresentados confirmam o protagonismo de XynB na degradação das cadeias de xilano da parede celular. Além disso, demonstrou-se que XynA é envolvida na hidrólise de oligossacarídeos, conhecidos ativadores da resposta imune de plantas. Foram descritos novos mecanismos implicados na degradação de xilano por *Xanthomonas* – a atividade de exo-oligoxilanase de XynA e estimulação por cálcio de XynB – que não só expandem os conhecimentos relacionados ao repertório funcional e regulatório da família GH10, como também demonstram o ótimo potencial de bactérias fitopatogênicas como fonte de novas atividades de hidrolases glicosídicas. A possibilidade de que XynA e XynB interajam no momento da infecção, contribuindo para a eliminação de elicitores da resposta imune, necessita ainda ser investigada em estudos *in vivo*.

8 – REFERÊNCIAS

Agência de Informação Embrapa - Pragas Quarentenárias. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia22/AG01/arvore/AG01_116_24112005115225.html>. Acesso em: 8 mar. 2015.

ALBERSHEIM, P; JONES, T M; ENGLISH, P D. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. **Annual review of phytopathology** v. 7, p. 171–94 , 28 jan. 1969. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.07.090169.001131?journalCode=phyto>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

AMARAL, Alexandre Morais Do. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado Técnico**, 86 p. 1–5 , 2003.

ATTÍLIO, Lísia Borges. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene D4E1 dirigido pelos promotores CaMV35S ou AtPP2**. Universidade de São Paulo, 2013. 82 p. Disponível em: <file:///C:/Users/zaira_001/Downloads/Lisia_Borges_Attilio.pdf>.

BAILEY, Michael J.; BIELY, Peter; POUTANEN, Kaisa. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology** v. 23, n. 3, p. 257–270 , maio 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816569290074J>>. Acesso em: 21 fev. 2015.

BANERJEE, Goutami *et al.* Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation. **Biotechnology and Bioengineering** v. 109, n. 4, p. 922–931 , abr. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.24385>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

BARELLI, Neldson Luis. **Estudo de caso de sucesso de erradicação de cancro cítrico em propriedade citrícola na região sul do estado de São Paulo Araraquara Março 2013** Estudo de caso de sucesso de erradicação de cancro cítrico em propriedade citrícola na região sul do estado de S. Fundo de Defesa da Citricultura, 2013. 25 p.

BEHLAU, Franklin. **Epidemiologia do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. citri) em laranja “Pêra” (*Citrus sinensis*) sob condições de controle químico e cultural**. Universidade de São paulo, 2006.

BLANVILLAIN, Servane *et al.* Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. **PloS one** v. 2, n. 2, p. e224 , jan. 2007. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000224>>. Acesso em: 2 jan. 2016.

BROEKAERT, W F *et al.* Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant physiology** v. 108, n. 4, p. 1353–8 , ago. 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=157512&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

BÜTTNER, Daniela; BONAS, Ulla. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS microbiology reviews** v. 34, n. 2, p. 107–33 , 1 mar. 2010. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/content/34/2/107.abstract>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

Cancro Cítrico, Xanthomonas citri subsp citri - Fundecitrus. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>>. Acesso em: 8 mar. 2015.

CHOW, V. *et al.* Xylan-utilization regulon in *Xanthomonas citri* pv. *citri* str. 306: Gene expression and utilization of oligoxylosides. **Applied and Environmental Microbiology** n. January, p. AEM.03091-14 , 2015. Disponível em: <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03091-14>>.

COLLINS, Tony; GERDAY, Charles; FELLER, Georges. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS microbiology reviews** v. 29, n. 1, p. 3–23 , 1 jan. 2005. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/content/29/1/3.abstract>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

DA SILVA, A. C. R. *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** v. 417, n. 6887, p. 459–463 , 23 maio 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/417459a>>. Acesso em: 7 fev. 2017.

DAVIES, Gideon; HENRISSAT, Bernard. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure** v. 3, n. 9, p. 853–859 , set. 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212601002209>>. Acesso em: 16 fev. 2015.

DAVIES, Gideon J.; WILSON, Keith S.; HENRISSAT, Bernard. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal** v. 321, n. 2, p. 557–559, 15 jan. 1997. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/content/321/2/557.abstract>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

DE JONGE, Ronnie *et al.* Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. **Science (New York, N.Y.)** v. 329, n. 5994, p. 953–5, 20 ago. 2010. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/329/5994/953.abstract>>. Acesso em: 12 jan. 2016.10.1126/science.1190859.

DÉJEAN, Guillaume *et al.* The xylan utilization system of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv *campestris* controls epiphytic life and reveals common features with oligotrophic bacteria and animal gut symbionts. **The New phytologist** v. 198, n. 3, p. 899–915, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23442088>>. Acesso em: 31 dez. 2015.

DERVILLY-PINEL, Gaud; THIBAUT, Jean-François; SAULNIER, Luc. Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. **Carbohydrate Research** v. 330, n. 3, p. 365–372, fev. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621500003001>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

DIOGO, José A *et al.* Development of a chimeric hemicellulase to enhance the xylose production and thermotolerance. **Enzyme and microbial technology** v. 69, p. 31–7, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022914002105>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

DODD, Dylan; CANN, Isaac K O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global change biology. Bioenergy** v. 1, n. 1, p. 2–17, 18 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2860967&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 fev. 2015.

DORAN-PETERSON, Joy *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation and partial saccharification and co-fermentation of lignocellulosic biomass for ethanol production. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)** v. 581, p. 263–80, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19768628>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

DOWSON, W.J. On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium*

for certain bacterial plant pathogens. **Transactions of the British Mycological Society** v. 26, n. 1–2, p. 4–14, abr. 1943. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153643800036>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

ELSHAHAWI, Sherif I. *et al.* A comprehensive review of glycosylated bacterial natural products. **Chem. Soc. Rev.** v. 44, n. 21, p. 7591–7697, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4CS00426D>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

ENKERLI, J. The Enzymatic Activity of Fungal Xylanase Is Not Necessary for Its Elicitor Activity. **PLANT PHYSIOLOGY** v. 121, n. 2, p. 391–398, 1 out. 1999. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/121/2/391.full>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

EVANGELISTA, Ramon A.; LIU, Ming-Sun.; CHEN, Fu-Tai A. Characterization of 9-Aminopyrene-1,4,6-trisulfonate Derivatized Sugars by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. **Analytical Chemistry** v. 67, n. 13, p. 2239–2245, jul. 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ac00109a051>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

FAO. **FAO Statistical Yearbook 2014 - Asia and the Pacific Food and Agriculture**. Bangkok: Food and Agriculture Organization of The United Nations, 2014a. 195 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3590e.pdf>>. .978-92-5-108146-4.

FAO. **FAO Statistical Yearbook 2014 - Latin America and the Caribbean Food and Agriculture**. Santiago: [s.n.], 2014b. 199 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/019/i3592e/i3592e.pdf>>. .978-92-5-108150-1.

FAURE, D. The Family-3 Glycoside Hydrolases: from Housekeeping Functions to Host-Microbe Interactions. **Applied and Environmental Microbiology** v. 68, n. 4, p. 1485–1490, 1 abr. 2002. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/68/4/1485.full>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

FIERENS, Katleen *et al.* His374 of wheat endoxylanase inhibitor TAXI-I stabilizes complex formation with glycoside hydrolase family 11 endoxylanases. **The FEBS journal** v. 272, n. 22, p. 5872–82, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16279951>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

FONSECA, Antonio Eduardo. **Análise de focos de cancro cítrico sob o programa de erradicação no Estado de São Paulo de 1999 a 2009**. Fundo de Defesa da Citricultura, 2012. 32 p.

FRY, S C *et al.* Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. **Plant**

Physiology v. 103, n. 1, p. 1–5 , set. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158939/>>.

FUJIMOTO, Zui *et al.* Crystal structures of the sugar complexes of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase: sugar binding structure of the family 13 carbohydrate binding module. **Journal of molecular biology** v. 316, n. 1, p. 65–78 , 8 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283601953380>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

FUNDECITRUS. *Cancro cítrico - Medidas Essenciais de Controle* .**Manual Técnico**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/manuais/cancro_essenciais_6.pdf>. , 2008

FUNDECITRUS. Novos caminhos para o cancro cítrico. **Citricultor** p. 16 , out. 2016. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/revista/novos-caminhos-para-o-cancro-citrico/46>>.

FUNDECITRUS. O controle nas mãos do citricultor. **Citricultor** p. 8–11 , 2013. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/revistas/PDF_site_ed_20.pdf>.

FUNDECITRUS. *Safra da laranja deve ser de 278,9 milhões de caixas*. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-da-laranja-deve-ser-de-2789-milhoes-de-caixas/316>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

Fundecitrus - Levantamentos - Cancro Cítrico. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/cancro-citrico/7>>. Acesso em: 8 mar. 2015.

FURMAN-MATARASSO, N. *et al.* A Point Mutation in the Ethylene-Inducing Xylanase Elicitor Inhibits the beta -1-4-Endoxylanase Activity But Not the Elicitation Activity. **Plant Physiology** v. 121, n. 2, p. 345–352 , 1 out. 1999. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/121/2/345.long>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

FUSHINOBU, Shinya *et al.* Structural basis for the specificity of the reducing end xylose-releasing exo-oligoxylanase from *Bacillus halodurans* C-125. **The Journal of biological chemistry** v. 280, n. 17, p. 17180–6 , 29 abr. 2005. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/280/17/17180.abstract>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

GALLARDO, Oscar *et al.* Structural insights into the specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and its improved stability by forced protein evolution. **The Journal of biological chemistry** v. 285, n. 4, p. 2721–33 , 22 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/285/4/2721.long>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

GOTTWALD, TR; GRAHAM, JH. A Device for Precise and Nondisruptive Stomatal Inoculation of Leaf Tissue with Bacterial Pathogens. **Phytopathology** v. 82, n. 9, p. 930–935 , 1992. Disponível em: <http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=4&SID=U15HiWZLTU7FET82zz4&page=1&doc=1>.

GRAHAM, Jh *et al.* Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology** v. 82, n. 11, p. 1319–1325 , 1992. Disponível em: <http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n11_1319.PDF>.

GRENNAN, Aleel K. Plant response to bacterial pathogens. Overlap between innate and gene-for-gene defense response. **Plant physiology** v. 142, n. 3, p. 809–11 , nov. 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1630729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

GUO, Bing *et al.* Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo-beta-1,4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. **Applied microbiology and biotechnology** v. 84, n. 6, p. 1107–15 , out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19506861>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

HANANIA, Uri; AVNI, Adi. High-affinity binding site for ethylene-inducing xylanase elicitor on *Nicotiana tabacum* membranes. **The Plant Journal** v. 12, n. 1, p. 113–120 , jul. 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.1997.12010113.x>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

HASSE, Clara H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal of Agricultural Research** v. 4, n. 1, p. 97–104 , 1915.

HESPELL, R B; COTTA, M A. Degradation and utilization by *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c of xylans with different chemical and physical properties. **Applied and environmental microbiology** v. 61, n. 8, p. 3042–50 , ago. 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=167580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

HOFFMAM, Zaira Bruna. **Estudos funcionais e estruturais de hemicelulases para potencial aplicação biotecnológica**. Universidade Estadual de Campinas, 2013. 66 p.

HONDA, Yuji; KITAOKA, Motomitsu. A family 8 glycoside hydrolase from *Bacillus halodurans* C-125 (BH2105) is a reducing end xylose-releasing exo-oligoxylanase. **The Journal of biological chemistry** v. 279, n. 53, p. 55097–103, 31 dez. 2004. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/279/53/55097.long>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

HU, Jinguang *et al.* Enzymatic Hydrolysis of Industrial Derived Xylo-oligomers to Monomeric Sugars for Potential Chemical/Biofuel Production. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering** v. 4, n. 12, p. 7130–7136, 5 dez. 2016. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssuschemeng.6b02008>>. Acesso em: 7 fev. 2017.

HU, Jun; QIAN, Wei; HE, Chaozu. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* eglXoB endoglucanase gene is required for virulence to rice. **FEMS microbiology letters** v. 269, n. 2, p. 273–9, 1 abr. 2007. Disponível em: <<http://femsle.oxfordjournals.org/content/269/2/273.abstract>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

IEA - INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. *Previsões e Estimativas das Safras Agrícolas do Estado de São Paulo, 2º Levantamento, Ano Agrícola 2015/16 e Levantamento Final, Ano Agrícola 2014/15, Novembro de 2015*. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=13982>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

JHA, Gopaljee; RAJESHWARI, R.; SONTI, Ramesh V. Bacterial Type Two Secretion System Secreted Proteins: Double-Edged Swords for Plant Pathogens. , 2005. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-18-0891>>. Acesso em: 27 dez. 2015.10.1094/MPMI-18-0891.

JHA, Gopaljee; RAJESHWARI, Ramanan; SONTI, Ramesh V. Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI** v. 20, n. 1, p. 31–40, 13 jan. 2007. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-20-0031>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

KALAKI, Rafael Bordonal; NEVES, Marcos Fava. Plano estratégico para o sistema agroindustrial citrícola brasileiro. **Gestão & Produção** n. ahead, p. 0–0, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-530X2017005001105&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 11 fev. 2017.

KELLER, Sandro *et al.* High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. **Analytical chemistry** v. 84, n. 11, p. 5066–73, 5 jun. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ac3007522>>. Acesso em: 13 jul. 2015.

KING, Brian C *et al.* Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnology for biofuels** v. 4, n. 1, p. 4 , 16 jan. 2011. Disponível em: <<http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-4-4>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

KOSHLAND, D. E. STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. **Biological Reviews** v. 28, n. 4, p. 416–436 , nov. 1953. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x>>. Acesso em: 9 set. 2016.

KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography** v. 34, n. 1, p. 33–41 , 1 fev. 2001. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?pe0064>>. Acesso em: 13 jul. 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** v. 227, n. 5259, p. 680–685 , 15 ago. 1970. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

LI, Jinyun; WANG, Nian. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. **PloS one** v. 6, n. 7, p. e21804 , 7 jan. 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021804>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

LIU, Yule *et al.* Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. **Cell** v. 121, n. 4, p. 567–77 , 20 maio 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867405002400>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

LOMBARD, Vincent *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic acids research** v. 42, n. Database issue, p. D490-5 , 1 jan. 2014. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/42/D1/D490.long>>. Acesso em: 20 out. 2015.

MARTINS, Luiza Helena da Silva; RABELO, Sarita Cândida; COSTA, Aline Carvalho Da. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology** v. 191, p. 312–321 , 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry** v. 31, n. 3, p. 426–428 , mar. 1959. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

MIRANDE, Caroline *et al.* Characterization of Xyn10A, a highly active xylanase from the human gut bacterium *Bacteroides xylanisolvens* XB1A. **Applied microbiology and biotechnology** v. 87, n. 6, p. 2097–105, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532756>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

NAJMUDIN, Shabir *et al.* Putting an N-terminal end to the *Clostridium thermocellum* xylanase Xyn10B story: crystal structure of the CBM22-1-GH10 modules complexed with xylohexaose. **Journal of structural biology** v. 172, n. 3, p. 353–62, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847710002236>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p. .978-85-363-2418-0.

PAËS, Gabriel; BERRIN, Jean-Guy; BEAUGRAND, Johnny. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology advances** v. 30, n. 3, p. 564–92, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011001844>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

PALVA, T K *et al.* *Induction of plant defense response by exoenzymes of Erwinia carotovora subsp. carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. [S.l: s.n.], 1993

PELICIC, Vladimir. Type IV pili: e pluribus unum? **Molecular microbiology** v. 68, n. 4, p. 827–37, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18399938>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

PELL, Gavin *et al.* The mechanisms by which family 10 glycoside hydrolases bind decorated substrates. **The Journal of biological chemistry** v. 279, n. 10, p. 9597–605, 5 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/279/10/9597.full>>. Acesso em: 9 dez. 2015.

PRESTON, Gail M; STUDHOLME, David J; CALDELARI, Isabelle. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. **FEMS microbiology reviews** v. 29, n. 2, p. 331–60, 1 abr. 2005. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/content/29/2/331.abstract>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

RAJESHWARI, R; JHA, Gopaljee; SONTI, Ramesh V. Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. **Molecular plant-**

microbe interactions : MPMI v. 18, n. 8, p. 830–7 , 5 ago. 2005. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-18-0830>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

RAY, S K; RAJESHWARI, R; SONTI, R V. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI** v. 13, n. 4, p. 394–401 , 19 abr. 2000. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.2000.13.4.394>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

ROSA, Janicéli. **Distribuição espacial e raio de agregação de cancro cítrico definidos por geostatística**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, 2010. 64 p.

RYAN, Clarence A. Oligosaccharide Signalling in Plants. **Annual Review of Cell Biology** doi: 10.1146/annurev.cb.03.110187.001455, v. 3, n. 1, p. 295–317 , 1 nov. 1987. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cb.03.110187.001455>>.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd. ed. [S.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p. .

SANTOS, Camila Ramos *et al.* Molecular mechanisms associated with xylan degradation by *Xanthomonas* plant pathogens. **The Journal of biological chemistry** v. 289, n. 46, p. 32186–200 , 14 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/early/2014/09/29/jbc.M114.605105>>. Acesso em: 19 fev. 2015.

SANTOS, Camila Ramos *et al.* Thermal-induced conformational changes in the product release area drive the enzymatic activity of xylanases 10B: Crystal structure, conformational stability and functional characterization of the xylanase 10B from *Thermotoga petrophila* RKU-1. **Biochemical and biophysical research communications** v. 403, n. 2, p. 214–9 , 10 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10020589>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

SCAPIN, Marcelo da Silva. **Adequação do volume de calda e dose de bactericida cúprico para o controle de cancro cítrico**. Fundo de Defesa da Citricultura, 2014. 32 p.

SCHAAD, Norman W *et al.* Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov.,

and X. **Systematic and applied microbiology** v. 28, p. 494–518 , 2005.

SCHAAD, Norman W. *et al.* Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus (DOI:10.1016/j.syapm.2005.03.017). **Systematic and Applied Microbiology** v. 29, p. 690–695 , 2006.

SCHUSTER, André; SCHMOLL, Monika. Biology and biotechnology of Trichoderma. **Applied microbiology and biotechnology** v. 87, n. 3, p. 787–99 , jul. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2886115&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

SHI, Hao *et al.* A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca²⁺ from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. **Biotechnology for biofuels** v. 6, n. 1, p. 26 , 18 jan. 2013. Disponível em: <<http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-6-26>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v. 59, n. 5, p. 223–233 , nov. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576501903649>>. Acesso em: 1 dez. 2015.

SOLOMON, V *et al.* Structure-specificity relationships of an intracellular xylanase from *Geobacillus stearothermophilus*. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography** v. 63, n. Pt 8, p. 845–59 , 17 ago. 2007. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?fw5130>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

SPURWAY, T. D. *et al.* Calcium Protects a Mesophilic Xylanase from Proteinase Inactivation and Thermal Unfolding. **Journal of Biological Chemistry** v. 272, n. 28, p. 17523–17530 , 11 jul. 1997. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/272/28/17523.full>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

SVERGUN, D.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. **Journal of Applied Crystallography** v. 28, n. 6, p. 768–773 , 1 dez. 1995. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?li5001>>. Acesso em: 28 jun. 2015.doi:10.1107/S0021889895007047.

SVERGUN, D I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography** v. 25, n. 4, p.

495–503 , 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1107/S0021889892001663>>.

SVERGUN, D I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical journal** v. 76, n. 6, p. 2879–86 , jun. 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1300260&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 jun. 2015.

SZCZESNY, Robert *et al.* Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. **The New phytologist** v. 187, n. 4, p. 983–1002 , set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20524995>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

THORSHEIM, Karin *et al.* Chemistry of xylopyranosides. **Carbohydrate Research** v. 418, p. 65–88 , dez. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621515003079>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

VAN VU, Ba *et al.* Cellulases belonging to glycoside hydrolase families 6 and 7 contribute to the virulence of *Magnaporthe oryzae*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI** v. 25, n. 9, p. 1135–41 , 1 set. 2012. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-02-12-0043-R>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

VERONESE, Paola *et al.* In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. **Plant physiology** v. 131, n. 4, p. 1580–90 , 1 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/131/4/1580.full>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

VOLKOV, Vladimir V.; SVERGUN, Dmitri I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. **Journal of Applied Crystallography** v. 36, n. 3, p. 860–864 , 16 abr. 2003. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?ks7125>>. Acesso em: 14 jun. 2015.

WANG, Guozeng *et al.* A novel cold-active xylanase gene from the environmental DNA of goat rumen contents: direct cloning, expression and enzyme characterization. **Bioresource technology** v. 102, n. 3, p. 3330–6 , fev. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410018067>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

YAMAZAKI, Akihiro; HIRATA, Hisae; TSUYUMU, Shinji. HrpG regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of General Plant Pathology** v. 74, n. 2, p. 138–150, 1 fev. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10327-008-0075-7>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

YOSHIZAWA, Takuya *et al.* Structural basis for inhibition of xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (XEG) by XEG-protein inhibitor. **The Journal of biological chemistry** v. 287, n. 22, p. 18710–6, 25 maio 2012. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/287/22/18710.full>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

YOUNG, J M *et al.* A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research** v. 21, n. 1, p. 153–177, fev. 1978. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00288233.1978.10427397#VTa2BpOXfvU>>. Acesso em: 21 abr. 2015.

ZHENG, Heping *et al.* Validation of metal-binding sites in macromolecular structures with the CheckMyMetal web server. **Nature protocols** v. 9, n. 1, p. 156–70, jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.172>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

ANEXO I: ARTIGO PUBLICADO

Molecular Mechanisms Associated with Xylan Degradation by *Xanthomonas* Plant Pathogens*

Received for publication, August 18, 2014, and in revised form, September 22, 2014. Published, JBC Papers in Press, September 29, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.605105

Camila Ramos Santos^{†1}, Zaira Bruna Hoffmam^{§1}, Vanesa Peixoto de Matos Martins^{†1}, Leticia Maria Zanphorlin[§], Leandro Henrique de Paula Assis[‡], Rodrigo Vargas Honorato[‡], Paulo Sérgio Lopes de Oliveira[‡], Roberto Ruller[§], and Mario Tyago Murakami^{‡2}

From the [†]Biosciences National Laboratory and [§]Bioethanol Science and Technology Laboratory, National Center for Research in Energy and Materials, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil

Background: The xylanolytic activity is important for adaptation of *Xanthomonas* phytopathogen to the phyllosphere.

Results: XynB is a very efficient endo-xylanase activated by calcium ion, and XynA is a dimeric exo-oligoxylanase.

Conclusion: XynB degrades xylan, releasing xylooligosaccharides that are substrate for XynA.

Significance: This work elucidated the structural basis for the function of the xylanolytic enzymes from *Xanthomonas*.

Xanthomonas pathogens attack a variety of economically relevant plants, and their xylan CUT system (carbohydrate utilization with TonB-dependent outer membrane transporter system) contains two major xylanase-related genes, *xynA* and *xynB*, which influence biofilm formation and virulence by molecular mechanisms that are still elusive. Herein, we demonstrated that XynA is a rare reducing end xylose-releasing exo-oligoxylanase and not an endo- β -1,4-xylanase as predicted. Structural analysis revealed that an insertion in the β 7- α 7 loop induces dimerization and promotes a physical barrier at the +2 subsite conferring this unique mode of action within the GH10 family. A single mutation that impaired dimerization became XynA active against xylan, and high endolytic activity was achieved when this loop was tailored to match a canonical sequence of endo- β -1,4-xylanases, supporting our mechanistic model. On the other hand, the divergent XynB proved to be a classical endo- β -1,4-xylanase, despite the low sequence similarity to characterized GH10 xylanases. Interestingly, this enzyme contains a calcium ion bound nearby to the glycone-binding region, which is required for catalytic activity and structural stability. These results shed light on the molecular basis for xylan degradation by *Xanthomonas* and suggest how these enzymes synergistically assist infection and pathogenesis. Our findings indicate that XynB contributes to breach the plant cell wall barrier, providing nutrients and facilitating the translocation of effector molecules, whereas the exo-oligoxylanase XynA possibly participates in the suppression of oligosaccharide-induced immune responses.

Cell wall-degrading enzymes (CWDEs)³ secreted by the type II secretion system (T2SS) are required for virulence and pathogenesis in the genus *Xanthomonas* (1–3). These enzymes such as xylanases, cellulases, and polygalacturonases degrade the main polysaccharides of plant cell walls, weakening the first physical barrier against pathogen attack and releasing nutrients during the colonization of plants (4–6). On the other hand, some CWDEs might have dual functions because their presence is sensed by plants, triggering defense responses (7). These enzymes can activate the innate immune system of plants by both pathogen-associated molecular patterns and damage-associated molecular patterns. In the pathogen-associated molecular pattern-triggered mechanism, CWDEs can elicit defense responses, independently of their enzymatic activity, as demonstrated for fungal xylanases (8, 9), which are recognized by specific receptors in the plant cell surface (10). In the damage-associated molecular pattern-triggered mechanism, the oligosaccharides produced by their enzymatic activity can activate the host innate immune system (11, 12) as demonstrated for plants pretreated with glycoside hydrolases, which showed enhanced resistance against pathogens (13). It is also proposed a functional interplay between the T2SS and type III secretion system (T3SS) in which the arsenal of CWDEs secreted by T2SS disrupts the plant cell wall integrity facilitating the translocation of effector proteins by T3SS (14, 15). Indeed, several T2SS genes from *Xanthomonas* spp. are coregulated with T3SS components supporting this model (14–16).

Interestingly, *Xanthomonas* pathogens contain a large repertoire of genes related to plant cell wall degradation and modification (at least 160 genes) that is equivalent to that observed in other bacteria specialized in biomass digestion such as *Ruminococcus albus* and *Clostridium cellulolyticum* (based on the CAZy database (17)). However, *Xanthomonas* spp. preferentially infect plants through stomata or lesions on leaves and

* This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grants 10/51890-8, 13/13309-0, and 14/07135-1; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grants 476043/2011-5 and 308092/2012-0; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

The atomic coordinates and structure factors (codes 4PMU, 4PMV, 4PMX, 4PMY, 4PMZ, and 4PN2) have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>).

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Brazilian Biosciences National Laboratory, National Center for Research in Energy and Materials, Giuseppe Maximo Scolfaro 10000, 13083-970, Campinas/SP, Brazil. Tel.: 55-19-3512-1106; Fax: 55-19-3512-1100; E-mail: mario.murakami@lnbio.cnpm.br.

³ The abbreviations used are: CWDE, cell wall-degrading enzyme; T2SS, type II secretion system; T3SS, type III secretion system; Xac, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; Xcc, *X. campestris* pv. *campestris*; Xoo, *X. orizae* pv. *orizae*; Xcv, *X. campestris* pv. *vesicatoria*; CE-LIF, capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence; RMSD, root mean square deviation; SAXS, small angle x-ray scattering.

ANEXO II: PARECER DA COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA

1. Título do projeto: **Estudo de enzimas xilanolíticas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306**

2. Pesquisadores responsáveis: Roberto Ruller e Mário Murakami

3. Experimentador: Zaira Bruna Hoffmam

Nível do treinamento do experimentador: ☐ -Iniciação científica, ☐ -mestrado, ☒ -doutorado,
☐ -doutorado direto, ☐ -pós-doutorado, ☐ -nível técnico, ☐ -outro, especifique: _____

4. Unidade operativa: ☐ LNLS ☐ LNNano ☒ CTBE ☒ LNBio

5. Classe de risco do OGM: ☒ Risco I ☐ Risco II ☐ Risco III ☐ Risco IV

6. O projeto é confidencial? ☒ não ☐ sim

7. O título do projeto pode constar em lista aberta no CNPEM? ☐ não ☒ sim

8. Qual é o objetivo do projeto?

O projeto "Estudo de enzimas xilanolíticas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306" é um trabalho de colaboração com LNBio e visa caracterizar bioquimicamente e biofísicamente hidrolases xilanolíticas do patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306. Para esse projeto, o DNA previamente extraído dessa bactéria será utilizado para amplificação e clonagem de genes codificadores de hemicelulases alvo, como *xac4254* e *xac4249*. Esses genes serão clonados e expressos utilizando como cepa hospedeira *Escherichia coli* DH5α e *Escherichia coli* BL21 DE3. Hemicelulases são hidrolases de glicosídeos que catalisam a hidrólise dos polissacarídeos hemicelulósicos, e que em atuação sinérgica com celulases promove a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar de maneira mais eficiente que as classes de enzimas isoladamente. Após expressão em *Escherichia coli* e purificação por cromatografias de afinidade, o potencial biotecnológico dessas enzimas será avaliado por meio de caracterização bioquímica. Essa caracterização compreende testes físico-químicos, como determinação de pH e temperaturas ótimas, estudos estruturais e rendimento de hidrólise de polissacarídeos.

9. Informe um número e nome para cada OGM, organismo receptor, organismo doador e o transgene.

(1) pET28a+ *xac4254* e pET28a+*xac4249*: vetores para expressão de proteínas em *E. coli* contendo os genes das hemicelulases de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306.

(2) *E. coli* BL21(DE3): cepa comercial da bactéria *Escherichia coli* para expressão de proteínas recombinantes.
 Genótipo: *fhuA2* [*lon*] *ompT* *gal* (λ DE3) [*dcm*] Δ *hsdS*
 λ DE3 = λ *sBamHI* Δ *EcoRI-B* int::(*lacI*::*PlacUV5*::T7 *gene1*) *i21* Δ *nin5*

10. Descreva brevemente a função dos transgenes de cada OGM:

(1) *E. coli* BL21(DE3) + pET28a+ *xac4254*: Expressão heteróloga do gene com atividade de xilanase.

(2) *E. coli* BL21(DE3) + pET28a+*xac4249*: Expressão heteróloga do gene com atividade de xilanase.

11. Algum OGM produz proteína tóxica, oncogênica ou pode gerar produtos deletérios para saúde humana, animal ou meio ambiente?

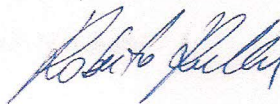
Não

12. Algum transgene confere infectividade ou patogenicidade para os OGMs? Descreva.

Não. Todos os transgenes construídos com o vetor de expressão pET28a apresentam marcador de resistência ao antibiótico kanamicina. Nenhum transgene confere infectividade ou patogenicidade ao organismo receptor.

O pesquisador principal tem conhecimento de que os experimentadores envolvidos devem ser supervisionados na execução do projeto e que é o responsável pelo treinamento de biossegurança adequado às suas necessidades para a manipulação, armazenamento, descarte e transporte de OGMs, atendendo a legislação e normativas preconizadas pela CTNBio, Anvisa e outros órgãos e agências regulamentadoras e fiscalizadoras.

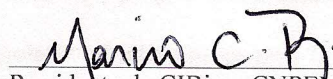
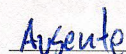
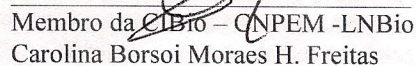
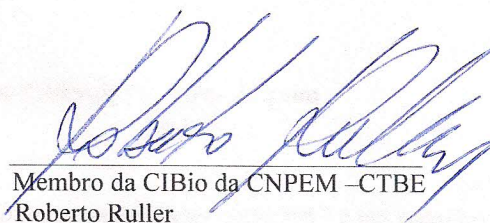
Assinatura eletrônica do pesquisador responsável:

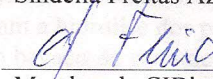


A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 20/9/2016.

Parecer final: ☒-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências.

comentários da CIBio:


Presidente da CIBio – CNPEM-LNBio
Marcio Chaim Bajgelman

Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
Celso Eduardo Benedetti

Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
Carolina Borsoi Moraes H. Freitas

Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
Roberto Ruller

Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
Sindélia Freitas Azzoni

Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
Marina Camara Mattos Martins Soldi

ANEXO III: DECLARAÇÃO REFERENTE A DIREITOS AUTORAIS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ESTUDO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* str. 306**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 25 de abril de 2017

Assinatura : Laura Bruna Hoffmann
Nome do(a) autor(a): **Zaira Bruna Hoffmann**
RG n.º 2071864 SSP/ES

Assinatura : Mário T. Murakami
Nome do(a) orientador(a): **Mário Tyago Murakami**
RG n.º